UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ANA PAULA DUARTE MOREIRA

DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS DE ALGINATO / BETA-FOSFATO TRICÁLCICO / ESTRÔNCIO PARA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE ESTRÔNCIO

RIO DE JANEIRO

2014

Ana Paula Duarte Moreira

DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS DE ALGINATO / BETA-FOSFATO TRICÁLCICO / ESTRÔNCIO PARA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE ESTRÔNCIO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Maria Helena Miguez da Rocha Leão

Glória Dulce de Almeida Soares

Rio de Janeiro

2014

Moreira, Ana Paula Duarte.

Desenvolvimento de microesferas de alginato / beta-fosfato tricálcico / estrôncio para liberação *in vitro* de estrôncio / Ana Paula Duarte Moreira – 2014.

f. 145: il. 63; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2014.

Orientadoras: Maria Helena Miguez da Rocha Leão / Glória Dulce de Almeida Soares.

1. Estrôncio. 2. Microesferas. 3. Liberação. 4. Ranelato de Estrôncio I. Leão, Maria Helena Miguez da Rocha / Soares, Glória Dulce de Almeida. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Desenvolvimento de microesferas de alginato / beta-fosfato tricálcico / estrôncio para liberação *in vitro* de estrôncio.

Ana Paula Duarte Moreira

DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS DE ALGINATO / BETA-FOSFATO TRICÁLCICO / ESTRÔNCIO PARA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE ESTRÔNCIO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

_____

Profa. Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D.Sc, EQ/UFRJ

_____

Profa. Glória Dulce de Almeida Soares, D.Sc, PEMM/UFRJ

_____

Profa. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, D.Sc, UNICAMP

_____

Prof. Marcos Farina de Souza, D.Sc, ICB/UFRJ

_____

Profa. Lidia Yokoyama, D.Sc, EQ/UFRJ

_____

Profa. Ana Maria Rocco, D.Sc, EQ/UFRJ

_____

Profa. Mariana de Mattos Vieira Mello Souza, D.Sc, EQ/UFRJ

“O personalismo, filho predileto do orgulho, arquiteta uma imagem exageradamente valorizada de nossas qualidades e conquistas, e quando somos convidados a uma incursão no mundo íntimo, através de críticas ou situações que nos obriguem a admitir a presença de determinada imperfeição, esquivamo-nos de todas as formas, não confessando a nós mesmos e quanto mais aos outros. (...) Humildade é a láurea de segurança para quantos anseiam por êxito nos seus investimentos de aperfeiçoamento”.

(Ermance Dufaux)

Aos meus "anjos" que, há pouco se foram,

não se encontram mais aqui na Terra encarnados...

Mas, certamente, não deixam de olhar por mim

e de estarem por perto...

A meu pai, Paulo, minha avó Ana e minha sogra, Vera.

AGRADECIMENTOS

A Deus por se fazer sempre presente nos momentos de fraqueza e aos bons espíritos por me fortalecerem mentalmente para cumprir mais essa etapa. Obrigada a todos vós por concederem mais uma realização profissional.

A minha mãe, Fatima, pelo apoio, carinho e por não se deixar abater pela minha atenção insuficiente e nervosismo. A toda minha família por todo amor e compreensão. Ao companheiro Leandro pelo encorajamento, paciência e fé confiada, por estar ao meu lado em grande parte da realização desse trabalho.

As minhas orientadoras, Profa. Maria Helena e Glória, pela oportunidade dada, pela paciência e confiança depositada no cumprimento dessa tese.

À amiga Márcia Sader pela orientação oferecida e grande ajuda durante a realização desse trabalho. Obrigada pelo encorajamento, incentivo e carinho que foram fundamentais para que eu completasse esse ciclo.

A amiga e técnica Aline Fernandes pela boa vontade e paciência na realização das análises de EAA e auxílio nas múltiplas contas analíticas. Obrigada pelo está mulo, encorajamento e amizade adquirida.

As amigas Renata Nunes e Luíza Sancier por toda ajuda prestada, pelas palavras de apoio e incentivo e pela amizade preciosa.

Aos amigos, Everton e Antonio pela amizade e momentos de descontração e pelas conversas na hora do almoço. Ao Leonardo Cescon pelas dúvidas sanadas, ideias e dicas oferecidas. Aos companheiros do Laboratório de Biopolímeros, em especial a querida Marianna, pela amizade, carinho, sorrisos e pelo apoio intelectual.

Aos colegas, Carlos Soriano pelo apoio e solicitude na realização das análises de UV-Vis e Sílvia Albuquerque pela prestatividade no fornecimento das informações técnicas.

Aos meus grandes amigos pelo incentivo e por entenderem os motivos de minha ausência.

A Profa. Rossana pela paciência e boa vontade em disponibilizar o laboratório para a realização dos experimentos. Aos funcionários do PEMM e a minha chefia que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos vocês por tudo, do fundo do meu coração.

RESUMO

MOREIRA, Ana Paula Duarte. **Desenvolvimento de microesferas de alginato / beta-fosfato tricálcico / estrôncio para liberação *in vitro* de estrôncio**. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2014.

Trabalhos científicos mostram que a presença do íon estrôncio influencia o mecanismo de remodelação óssea, estimulando a produção de osteoblastos e inibindo a diferenciação dos osteoclastos. Uma das fontes de estrôncio empregada para esse fim é o fármaco Ranelato de Estrôncio (SrRan, Protelos®) administrado via oral. Esse trabalho teve como objetivo produzir microesferas de alginato (ALG)/beta-fosfato tricálcico (β-TCP)/estrôncio (Sr) para uso como material de enxerto. As microesferas foram produzidas pelo processo de extrusão e o íon estrôncio foi incorporado por duas diferentes rotas: empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 e 1,50 $mol.L^{-1}$) e empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% e 38,5%). Os sais cloreto de estrôncio e SrRan eram a fonte de Sr e o agente gelificante do processo. Concentração de estrôncio na faixa de 0,37 – 1,18% foram obtidas, sendo que o íon se encontra mais concentrado na superfície da microesfera. Os testes *in vitro* mostraram que há uma liberação máxima de estrôncio em 24h (48% e 14% em pH 4,0 e 7,4, respectivamente) para as microesferas produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio menos concentrada e de 89% e 51% em pH 4,0 e 7,4, respectivamente, para as microesferas produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio mais concentrada. Para as microesferas produzidas empregando menor concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio, há uma liberação máxima em 12h (99% e 69% em pH 4,0 e 7,4, respectivamente) e de 87% e 23% em pH 4,0 e 7,4, respectivamente, para as microesferas produzidas empregando maior concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio. Esses resultados podem ser explicados pelo mecanismo de dissolução atuante, onde o pH ácido promove preferencialmente a dissolução da fração inorgânica (β-TCP) e o pH neutro promove o rompimento das ligações coordenadas. Mudanças físico-químicas relevantes não foram identificadas. Os ensaios de adsorção do ranelato de estrôncio às microesferas de ALG/β-TCP gelificadas com cloreto de cálcio indicaram que a incorporação do íon estrôncio é elevada (1,15%) utilizando esse processo, porém o método envolve duas etapas de produção para as microesferas. As microesferas de ALG/β-TCP)/Sr não apresentaram citotoxicidade podendo ser aplicadas na regeneração de tecido ósseo com liberação *in situ* de estrôncio.

Palavras-chave: Estrôncio, microesferas, liberação, ranelato de estrôncio.

ABSTRACT

MOREIRA, Ana Paula Duarte. **Desenvolvimento de microesferas de alginato / beta-fosfato tricálcico / estrôncio para liberação *in vitro* de estrôncio**. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2014.

Studies have shown that the presence of strontium ion affects the bone remodelling, stimulating the osteoblasts production and inhibiting osteoclast differentiation. One of the strontium sources used for this purpose is Strontium Ranelate (SrRan, Protelos®) administered orally. This work aims to produce microspheres of alginate (ALG)/beta-tricalcium phosphate (β-TCP/strontium (Sr) as graft material. The microspheres were produced by the extrusion method and the strontium ion was incorporated by two different routes: using a strontium chloride solution (0.15 e 1.50 $mol.L^{-1}$) and strontium ranelate drug (3.85 e 38.5 wt. %). The strontium compounds, strontium chloride and SrRan were the Sr source and gelling agents in the extrusion process. Strontium concentrations in the range of 0.37 to 1.18 wt. % were obtained, and the ion is more concentrated on the surface of the microsphere. In vitro tests showed that there is a strontium burst release at 24h (48% and 14% at pH 4.0 and 7.4, respectively) for microspheres produced using lower concentrations of strontium chloride solution and at 12h (99% and 69% at pH 4.0 and 7.4, respectively) for the microspheres produced using lower concentrations of the strontium ranelate drug. This behaviour can be explained by the dissolution mechanism where acid pH promotes inorganic phase degradation and neutral pH promotes disruption of the crosslinking matrix. Relevant physicochemical changes were not identified. Strontium ranelate adsorption experiments on ALG/β-TCP microspheres using calcium chloride as crosslinking agent indicated that strontium ion incorporation is higher (1.15 wt. %) using this process. However, the method involves two steps for the microspheres production. ALG/β-TCP/Sr microspheres were not considered cytotoxic and can be applied in the bone tissue regeneration with strontium *in situ* release.

Keywords: Strontium, Microspheres, Release, Strontium ranelate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Princípio da engenharia tecidual. (Extraída de MENAA, MENAA, MENAA, 2011). 4

Figura 2: Esquema de liberação de fármacos em sistema de liberação controlada (Adaptada de BOSE e TARAFDER, 2012). 5

Figura 3: (a) Estrutura cristalina do β-TCP pela projeção no plano 001. (b) e (c) Configurações dos grupos CaO_n e PO_4 ao longo do eixo *c*. Configurações obtidas pelo software VCIS (Extraída de MASATOMO, YASHIMA *et al.*, 2003). 14

Figura 4: Atuação do estrôncio nos processos de formação e reabsorção óssea (Adaptada de MARIE, 2006). 16

Figura 5: Estrutura química do ranelato de estrôncio (SWAMI, PISHAWIKAR, MORE, 2012). 21

Figura 6: Processo de remodelação óssea mediada por RANK/RANKL/OPG (Adaptada de SAIDAK e MARIE, 2012). 22

Figura 7: Efeito do estrôncio na ação do receptor sensível de cálcio (CaSR) nos processos de formação e reabsorção óssea (Adaptado de SAIDAK e MARIE, 2012). 23

Figura 8: Estrutura dos homopolímeros que constituem a molécula de alginato. (a) Sequência em bloco de unidades G, (b) Sequência em bloco de unidades M e (c) Sequência alternada de unidades MGM (Extraída de LEE e MOONEY, 2012). 27

Figura 9: Modelo de "egg-box" do alginato de cálcio (KASHIMA e IMAI, 2012). 28

Figura 10: Esquema representativo do sistema de extrusão para formação de microesferas de alginato. 30

Figura 11: Fatores que influenciam os processos de adsorção de proteínas, adesão e diferenciação celular (Adaptada de SAMAVEDI, WHITTINGTON, GOLDSTEIN, 2013). 32

Figura 12: Fluxograma esquemático para a produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr. . 38

Figura 13: Espectro de absorção no UV-Vis do ranelato de estrôncio em diferentes concentrações. 43

Figura 14: Curva analítica do Ranelato de Estrôncio. 44

Figura 15: Difratograma de raios X das amostras CDHA e β-TCP. 50

Figura 16: Diagramas obtidos pelo programa Match!: (a) CDHA e (b) β-TCP (curva azul – difratograma experimental; curva vermelha – difratograma teórico). 51
Figura 17: Espectros de FTIR das amostras CDHA e β-TCP.....52
Figura 18: Difratograma de raios X do alginato de sódio. 53
Figura 19: Espectro de FTIR do alginato de sódio.....54
Figura 20: Difratograma de raios X do ranelato de estrôncio. Detalhe na faixa de 2θ (7 a 15º). 55
Figura 21: Espectro de FTIR do ranelato de estrôncio.....56
Figura 22: Distribuição de tamanho das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}) como agente reticulante.....58
Figura 23: (a) DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}) e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º).....59
Figura 24: Espectro de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}).....61
Figura 25: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}): (a) Aumento de 500x, (b) Aumento de 10.000x, mostrando em detalhe a presença de poros na escala de 1 a 1,5 µm e (c) Espectro de EDS. 62
Figura 26: (a) Micrografia da seção transversal das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}) e (b) Espectro de EDS da seção transversal. 63
Figura 27: Curva de TG/DTG das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}).....65
Figura 28: Distribuição de tamanho das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de cloreto de estrôncio (1,50 mol.L^{-1}).....66
Figura 29: a) DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de cloreto de estrôncio (1,50 mol.L^{-1}) e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º). 67
Figura 30: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de cloreto de estrôncio (1,50 mol.L^{-1}): (a) Aumento de 200x, (b) Aumento de 5.000x, mostrando em detalhe a presença de poros na escala de 1 a 1,5 µm e (c) Espectro de EDS. 69

Figura 31: Perfil de liberação acumulativa de cálcio e estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) em função do tempo de imersão: (a) pH 4,0 e (b) pH 7,4 e detalhe em menor escala do perfil de liberação de Ca e Sr. M = Ca ou Sr. 73

Figura 32: Massa de estrôncio presente nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após diferentes tempos de imersão..... 76

Figura 33: Variação de pH durante os testes *in vitro* das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0m,15 mol.L^{-1}). 77

Figura 34: Difratograma de raios X das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após o ensaio de dissolução em pH 4,0..... 78

Figura 35: Espectro de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após o ensaio de dissolução: (a) pH 4,0 e (b) pH 7,4..... 80

Figura 36: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após teste *in vitro* em pH 4,0 com diferentes tempos de imersão, aumento de 200x: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 7 dias e (d) 14 dias. 81

Figura 37: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após teste *in vitro* em pH 4,0 com aumento de 5.000x: (a) 24 h e (b) 14 dias. Detalhe para o aparecimento de placas. 82

Figura 38: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após teste *in vitro* em pH 7,4 com diferentes tempos de imersão, aumento de 200x: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 7 dias e (d) 14 dias. 83

Figura 39: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após teste *in vitro* em pH 7,4 com aumento de 5.000x: (a) 24 h e (b) 14 dias. Detalhe para o aparecimento de placas. 84

Figura 40: Liberação de cálcio e estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de $SrCl_2$ (1,5 mol.L^{-1}) após 24h de imersão. M = Ca ou Sr. 85

Figura 41: Distribuição de tamanho das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando uma mistura (1:1) de solução de cloreto de cálcio (0,15 mol.L^{-1}) e menor concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v). 88

Figura 42: (a) DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v) e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º). 89

Figura 43: Espectro de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v). 90

Figura 44: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v): (a) Aumento de 200x, (b) Aumento de 5.000x, mostrando em detalhe a presença de poros na escala de 1 a 1,5 µm e (c) Espectro de EDS. 91

Figura 45: (a) Micrografia da seção transversal das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v) e (b) Espectro de EDS da seção transversal. 92

Figura 46: Curva de TG/DTG das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v). 93

Figura 47: Distribuição de tamanho das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando uma mistura (1:1) de solução de cloreto de cálcio (0,15 $mol.L^{-1}$) e maior concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (38,5% p/v). 94

Figura 48: DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (38,5% p/v) em maior concentração e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º). 95

Figura 49: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (38,5% p/v) em maior concentração. (a) Aumento de 200x, (b) Aumento de 5.000x, mostrando em detalhe a presença de poros na escala de 1 a 1,5 µm e (c) Espectro de EDS. 96

Figura 50: Espectro de UV-Vis do Ranelato de Estrôncio presente nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr obtidas empregando o fármaco SrRan (3,85%). 99

Figura 51: Perfil de liberação acumulativa de cálcio e estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%) em função do tempo de imersão: (a) pH 4,0 e (b) pH 7,4 e detalhe em menor escala do perfil de liberação de Ca e Sr. M = Ca ou Sr. 101

Figura 52: Variação de pH durante os testes *in vitro* das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%). 103

Figura 53: Difratograma de raios X das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%) após o ensaio de dissolução em pH 4,0. 104

Figura 54: Espectro de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%) após o ensaio de dissolução: (a) pH 4,0 e (b) pH 7,4.....105

Figura 55: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%) após teste *in vitro* em pH 4,0 com diferentes tempos de imersão, aumento de 200x: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 7 dias e (d) 14 dias. 107

Figura 56: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando o fármaco SrRan (3,85%) após teste *in vitro* em pH 4,0 com aumento de 5.000x: (a) 48 h e (b) 14 dias. Detalhe para o aparecimento de placas. 108

Figura 57: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando o fármaco SrRan (3,85%) após teste *in vitro* em pH 7,4 com diferentes tempos de imersão, aumento de 200x: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 7 dias e (d) 14 dias.....109

Figura 58: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando o fármaco SrRan (3,85%) após teste *in vitro* em pH 7,4 com aumento de 5.000x: (a) 24 h e (b) 14 dias..110

Figura 59: Concentração de cálcio e estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de SrRan (38,5%) após 24h de imersão. 111

Figura 60: Perfil de inchamento das microesferas de ALG/β-TCP/Sr: (a) em água e (b) em PBS.....113

Figura 61: Ensaio de citotoxicidade e proliferação celular das microesferas de ALG/β-TCP/Sr através dos métodos: (a) XTT, (b) NR, vermelho neutro e (c) CVDE, cristal violeta. *Diferença significativa em relação aos materiais testados ($p < 0.01$). 116

Figura 62: Difratograma de raios X das microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após ensaio de adsorção com SrRan e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º).....118

Figura 63: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após ensaio de adsorção com SrRan: (a) e (b) Empregando solução menos concentrada de SrRan 3,85%; (c) e (d) Empregando solução mais concentrada de SrRan 38,5%. 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Biomateriais empregados na área ortopédica (NAVARRO, 2008).....7
Tabela 2: Ocorrência de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).....10
Tabela 3: Principais CaP empregados como biomateriais (KAILI, LIN; CHENGTIE, WU; JIANG, CHANG, 2014).....11
Tabela 4: Polímeros biodegradáveis usados na engenharia tecidual como *scaffolds* e em sistemas de liberação controlada (SLC) (TABATA, 2009). 25
Tabela 5: Valores distintos de 2θ para as três formas cristalinas do ranelato de estrôncio.....55
Tabela 6: Concentração de Sr obtida pelo método direto (abertura da amostra e leitura por EAA) a partir das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas. 70
Tabela 7: Concentração de Ca e Sr obtida pelo método indireto (leitura das soluções antes de depois da produção por EAA) a partir das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas..71
Tabela 8: Porcentagem de estrôncio presente nas microesferas produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio e porcentagem de liberação do íon estrôncio durante os testes *in vitro*. 86
Tabela 9: Concentração de Ca e Sr obtida pelo método direto a partir das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio. 97
Tabela 10: Concentração de Ca e Sr obtida pelo método indireto a partir das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio. 98
Tabela 11: Porcentagem de estrôncio presente nas microesferas produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio e porcentagem de liberação do íon estrôncio durante os testes *in vitro*. 112
Tabela 12: Concentração de Sr e Ca presentes nas microesferas de ALG/β-TCP após ensaio de adsorção com SrRan. 120

LISTA DE ABREVIATURAS

ALG	Alginato
ALG/β-TCP/Sr	Microesferas de alginato/β-fosfato tricálcico/estrôncio produzidas por dois métodos de preparação: empregando solução de $SrCl_2$ e empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio
ALG/β-TCP/SrRan	Microesferas de alginato/β-fosfato tricálcico/ranelato de estrôncio obtidas após teste de adsorção do fármaco Ranelato de Estrôncio
ALP	Fosfatase alcalina
ATR	Attenuated total reflectance – Reflectância total atenuada
BPs	Bisfosfonatos
BSP	Sialoproteína óssea
Ca/P	Razão cálcio/fósforo
CaP	Fosfatos de cálcio
CaSR	Receptor extracelular de membrana sensível a cálcio
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CDHA	Hidroxiapatita cálcio-deficiente
COPPE	Coordenação dos Programas de Pós-Graduação de Engenharia
CVDE	Crystal violet dye elution
DCPD	Dicalcium phosphate anhydrous - Brushita
DDS	Drug delivery system
DMO	Densidade mineral óssea
DRX	Difração de raios X
DTG	Derivada da curva de análise termogravimétrica
EAA	Espectrofotometria de absorção atômica por chama
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva

EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
FWHM	Full width at half height
GG	Unidades de ácido α-L-gulurônico
HA	Hidroxiapatita
HPLC	High-performance liquid chromatography
IME	Instituto Militar de Engenharia
ISO	International Organization for Standardization
JCPDS	Joint Committee of Powder Diffraction Standards
K_a	Constante de dissociação ácida
K_b	Constante de dissociação básica
K_h	Constante de hidrólise
LabTer	Laboratório de Termoanálise e Reologia
LMCM	Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais
M-CSF	Fator estimulador das colônias de macrófagos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MG	Unidades alternadas dos ácidos β-D-manurônico e α-L-gulurônico
MM	Unidades de ácido β-D-manurônico
NR	Neutral red
OCN	Osteocalcina
OCP	Fosfato octacálcico
OMS	Organização Mundial de Saúde

OPG	Osteoprotegerina
PBS	Phosphate buffer saline
PDF	Powder Diffraction File
PEMM	Programa em Engenharia Metalúrgica e de Materiais da COPPE/UFRJ
PTH	Hormônio da paratireoide
RANKL	Ligante do receptor de fator nuclear k-B
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SERMs	Moduladores seletivos de receptor de estrogênio
SFB	Soro fetal bovino
SLC	Sistema de liberação controlada
SrRan	Ranelato de estrôncio
TCP	Fosfato tricálcico
TG	Análise termogravimétrica
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível
XTT	Hidróxido de 2,3-bis[2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil]-5-(carbonil fenilamina)-2H-tetrazólio
A	Grau de dissociação
α-MEM	Alpha modified minimum essential medium

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 BIOMATERIAIS PARA SUBSTITUIÇÃO E REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO – MEDICINA REGENERATIVA 3
2.2 BIOCERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO 9
2.2.1 Substituições de Cálcio por Estrôncio em Fosfatos de Cálcio 14
2.3 ESTRÔNCIO E RANELATO DE ESTRÔNCIO 15
2.3.1 Importância do Estrôncio (Sr) 16
2.3.2 Uso do Ranelato de Estrôncio (SrRan) 18
2.4 COMPÓSITOS ALGINATO/FOSFATO DE CÁLCIO 24
2.5 TESTES *IN VITRO* E DISSOLUÇÃO DOS FOSFATOS DE CÁLCIO 31
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 35
4 MATERIAIS E MÉTODOS 37
4.1 PREPARAÇÃO E OBTENÇÃO DO β-TCP 37
4.2 PRODUÇÃO DE MICROESFERAS DE ALG/β-TCP INCORPORADAS COM ÍON ESTRÔNCIO 37
4.2.1 Incorporação do Íon Estrôncio empregando Solução de Cloreto de Estrôncio 38
4.2.2 Incorporação do Íon Estrôncio empregando o Fármaco Ranelato de Estrôncio 39
4.3 ENSAIO DE ADSORÇÃO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO 40
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE ALG/β-TCP/Sr 40
4.4.1 Análise Química 40
4.4.2 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) 41
4.4.3 Difração de raios X (DRX) 44
4.4.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 45
4.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) 45
4.4.6 Análise termogravimétrica (TG) 45
4.5 TESTES *IN VITRO* DE DISSOLUÇÃO E LIBERAÇÃO DE ESTRÔNCIO 46
4.6 TESTE DE INCHAMENTO 46
4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE 47

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS DE PARTIDA 49
5.1.1 Caracterização do pó de beta-fosfato tricálcico 49
5.1.2 Caracterização do alginato 53
5.1.3 Caracterização do ranelato de estrôncio 54
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS MICROESFERAS DE ALG/β-TCP/Sr 57
5.2.1 Microesferas produzidas pela incorporação do íon estrôncio empregando solução menos concentrada de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}) 57
5.2.2 Microesferas produzidas pela incorporação do íon estrôncio empregando solução mais concentrada de cloreto de estrôncio (1,50 mol.L^{-1}) 65
5.2.3 Análise química das microesferas produzidas através da incorporação do íon estrôncio empregando solução de cloreto de estrôncio 69
5.3 TESTES *IN VITRO* DE DISSOLUÇÃO E LIBERAÇÃO DE ESTRÔNCIO 72
5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS MICROESFERAS DE ALGINATO/β-TCP/Sr 87
5.4.1 Microesferas produzidas pela incorporação do íon estrôncio empregando uma mistura (1:1) de solução de cloreto de cálcio (0,15 mol.L^{-1}) e menor concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v) 87
5.4.2 Microesferas produzidas pela incorporação do íon estrôncio empregando uma mistura (1:1) de solução de cloreto de cálcio (0,15 mol.L^{-1}) e maior concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (38,5% p/v) 93
5.4.3 Análise química das microesferas produzidas através da incorporação do íon estrôncio empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio 96
5.5 TESTES *IN VITRO* DE DISSOLUÇÃO E LIBERAÇÃO DE ESTRÔNCIO 100
5.6 TESTES DE INCHAMENTO 112
5.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE 115
5.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS MICROESFERAS DE ALG/β-TCP/SrRan 117
5.8.1 Microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após ensaio de adsorção do fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v e 38,5%) 117
5.8.2 Análise química das microesferas 119
6 **CONSIDERAÇÕES FINAIS** 122
7 CONCLUSÕES 126
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 129

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 130
APÊNDICE 141

1 INTRODUÇÃO

O avanço da expectativa de vida da população mundial está associado a melhorias nas condições de vida no que se refere à saúde, educação, saneamento básico, meio-ambiente, situação socioeconômica, estilo de vida e avanços na medicina. Consequentemente, isso induz a um aumento natural da população de idosos.

O crescimento da população de idosos, o aumento no número de patologias e acidentes envolvendo fraturas e perdas ósseas geram altos gastos para o sistema de saúde pública em termos de medicamentos e cirurgias. Por outro lado, estimulam o desenvolvimento de terapias, medicamentos e novos materiais que visem prevenir ou retardar as doenças, acelerar a recuperação dos pacientes e aumentar a qualidade de vida da população.

Os avanços da engenharia tecidual e da medicina reconstrutiva conduzem à elaboração de novos materiais que associados à fatores de crescimento, marcadores ósseos entre outros, possam ser aplicados de forma permanente ou temporária no organismo. Em se tratando do tecido ósseo, biomateriais com o perfil similar de cristalinidade e composição e com propriedades físico-químicas semelhantes ao osso têm sido desenvolvidos para serem utilizados na substituição, restauração ou regeneração das funções teciduais perdidas. Materiais biocerâmicos à base de fosfatos de cálcio, como beta-fosfato tricálcico (β-TCP), têm sido amplamente aplicados e, associados a células, fatores de crescimento, drogas ou genes, podem restaurar, manter ou melhorar a função do tecido onde são implantados (LANGER & VACANTE, 1993).

Biomateriais à base de β-TCP são empregados, principalmente, no preenchimento de defeitos como regeneradores ósseos, tanto na área médica quanto odontológica. Devido à biocompatibilidade, osseoindução e biodegradabilidade desses materiais, eles promovem o crescimento ósseo e a regeneração do tecido danificado. A estrutura química do β-TCP permite substituições iônicas que modificam suas propriedades influenciando no seu comportamento biológico. A solubilidade é um dos fatores mais afetados por essas substituições, pois criam-se defeitos na rede, alterando a taxa dissolução. Nas últimas décadas, houve um aumento em trabalhos relacionados à substituição pelo íon estrôncio, pois

estudos mostraram que o estrôncio tem um efeito benéfico no osso, uma vez que ele atua positivamente no processo de remodelação óssea.

A substituição por estrôncio tem sido foco de grande interesse pelos pesquisadores, pois ele tem sido empregado como medicamento, na forma de ranelato de estrôncio. Trata-se de um fármaco comercializado pela Protelos® para o tratamento da osteoporose, como promotor do aumento da densidade mineral óssea e da diminuição de fraturas. O ranelato de estrôncio (SrRan) surgiu como um novo medicamento no tratamento da doença, pois ele aumenta a proliferação e diferenciação das células osteoblásticas, estimulando a formação local das células ósseas e diminui o número e a atividade das células osteoclásticas, conduzindo a um equilíbrio no processo de formação-reabsorção óssea (MENTAVERRI *et al*., 2012).

Sendo assim, a presença do íon estrôncio estando ele na forma de ranelato de estrôncio ou na estrutura do beta-fosfato tricálcico tornou-se importante, principalmente, na avaliação sobre a dissolução do material e liberação desse íon no organismo, já que a concentração local de íons estrôncio influencia na atividade celular.

Compósitos de fosfatos de cálcio com alginato são considerados "*smart biomaterials*", pois induzem a proliferação celular e melhoram a integração do biomaterial implantado com o tecido. Os compósitos de alginato/β-TCP apresentam maior resistência mecânica e estabilidade, elevando assim o tempo de degradação (HOLZAPFEL *et al*, 2013). Dessa forma, esses materiais são promissores na aplicação como sistema de liberação controlada e como forma de dispor uma nova geração de biomateriais para tratamentos de pacientes que apresentam perda óssea considerável. Por esse motivo é fundamental avaliar o efeito da presença do íon estrôncio em compósitos alginato/β-TCP e conhecer suas propriedades físico-químicas, a fim de que ele não se torne um elemento citotóxico.

Neste sentido, este trabalho visa a produção de microesferas de alginato/fosfato de cálcio/estrôncio obtidas empregando-se duas fontes distintas de estrôncio, ranelato de estrôncio e cloreto de estrôncio, com objetivo de estudar a liberação *in vitro* de estrôncio em um ambiente simulando o meio fisiológico e outro inflamatório e avaliar as alterações físico-químicas decorrentes dessa liberação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAIS PARA SUBSTITUIÇÃO E REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO – MEDICINA REGENERATIVA

O aumento da expectativa de vida da população é decorrente, em parte, dos avanços na medicina, conduzindo a uma população idosa brasileira, em 2020, da ordem de 25-30 milhões. Por outro lado, o crescente número de lesões traumato-ortopédicas e de doenças ósseo degenerativas estimula o desenvolvimento de terapias que visem preservar, melhorar ou restaurar as funções teciduais (O'BRIEN, 2011).

A medicina regenerativa é uma área promissora da medicina e aborda um novo conceito que tem como objetivo manter, reparar e ampliar a capacidade natural de regeneração tecidual. A medicina regenerativa traz expectativas de melhora para um grande número de doenças atuais e emprega estratégias para o reparo ou substituição de órgãos, tecidos e células, lesionados ou degenerados, através da engenharia celular e tecidual (BOROJEVIC, 2005; ENGEL *et al.*, 2007; SOARES, 2005).

A medicina regenerativa é aplicada, principalmente, nas áreas cardiovascular, buco-maxilo-facial, ortopédica e estética. Na área ortopédica, as doenças e lesões ósseas podem conduzir a uma degeneração do tecido, necessitando de tratamentos para reparar a região afetada. O tratamento mais comum envolve cirurgias de reconstrução e transplante autólogo ou alogênico de tecidos. Embora sejam alternativas eficazes, essas cirurgias são caras, dolorosas e restritas a determinadas regiões. São tratamentos bastante invasivos, sendo necessária em alguns casos, uma posterior cirurgia que pode ocasionar morbidez do paciente. Outro fator importante é a possibilidade de infecção e rejeição do tecido implantado, o que gera a necessidade contínua do uso de medicamentos (SOO-HONG, LEE e HEUNGSOO, SHIN, 2007; TABATA, 2009).

A engenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve princípios da medicina, engenharia mecânica, ciência dos materiais, genética e outras áreas relacionadas para desenvolver novos materiais que visam acelerar a regeneração e o reparo da função tecidual comprometida. Essa capacidade de auto reparação do tecido lesionado depende do

grau do dano, do tipo de tecido e se houve perda ou não da função local (CHEN, LIANG, THOUAS, 2013; O'BRIEN, 2011).

A principal abordagem da engenharia tecidual envolve a combinação de células *in vitro* em estruturas ordenadas (arcabouços ou *scaffolds*), compostas de um biomaterial. Esse conjunto é introduzido na região lesionada mimetizando o funcionamento da matriz extracelular, em uma organização tridimensional, propiciando *in vitro* uma melhor adesão, mobilização, proliferação e integração das células regenerativas, promovendo o reparo e a renovação dos tecidos degenerados (Figura 1) (CGEE, 2010; CHEN, LIANG, THOUAS, 2013; ENGEL *et al.*, 2007).

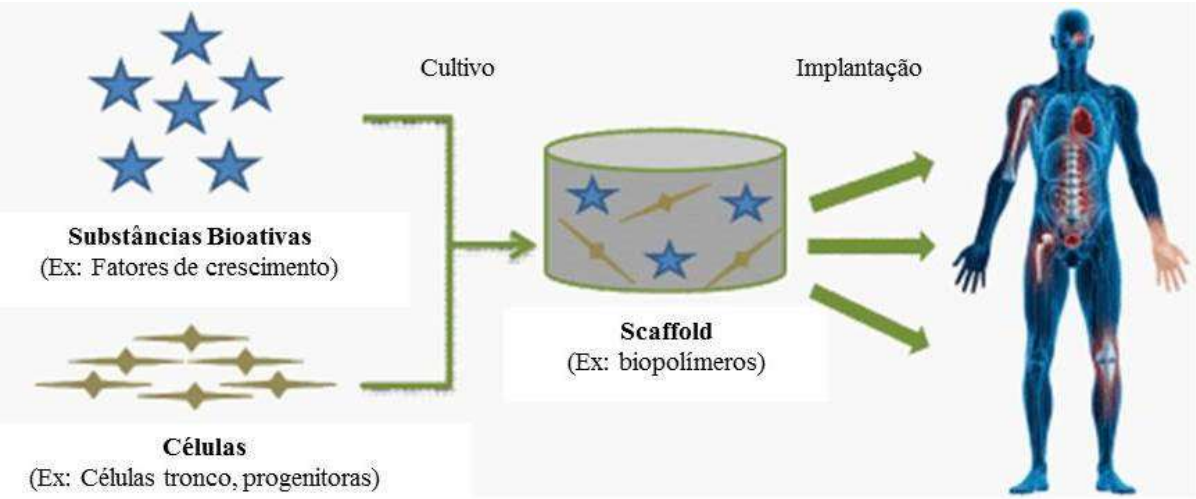


Figura 1: Princípio da engenharia tecidual. (Extraída de MENAA, MENAA, MENAA, 2011).

Os chamados *scaffolds* são arcabouços 3D porosos que servem de suporte para os novos tecidos formados. Os *scaffolds* devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, promover a interação celular e possuir propriedades físico-químicas e mecânicas adequadas para a regeneração do tecido (MOURIÑO e BOCCACCINI, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SUN e TAN, 2013.).

Para que um *scaffold* de um biomaterial seja aplicado na regeneração óssea, ele deve mimetizar a morfologia, estrutura e função óssea a fim de induzir a conexão com os tecidos. De um modo específico, o arcabouço deve possuir quantidade de poros suficiente para acolher as células ósseas e estimular sua proliferação; alta interconectividade entre os poros, para facilitar a adesão e distribuição uniforme das células e a difusão de oxigênio, nutrientes e

metabólicos para fora do ambiente e, sua taxa de degradação deve se aproximar da taxa de formação do novo tecido ósseo (LIU & MA, 2004; LIU, XIA, CZERNUSZKA, 2007).

Além de servir como arcabouço para adesão, proliferação e diferenciação celular na formação da matriz extracelular, os *scaffolds* também servem como carreadores de células, fármacos e fatores de crescimento e podem ser usados em sistemas de liberação controlada (LIU, XIA, CZERNUSZKA, 2007), que é uma das áreas também prioritárias dentro de Materiais para a Saúde. Atualmente, muitos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de *scaffolds* com capacidade de liberação de agentes terapêuticos.

O sistema de liberação controlada (SLC) ou *drug delivery system* (DDS) permite um aumento da concentração local da substância bioativa, por meio de uma liberação progressiva, no local da implantação. Dessa forma, a concentração da substância é mantida num nível desejado por um determinado tempo (DESCAMPS, HORNEZ, LERICHE, 2009).

A liberação da substância bioativa (ou fármaco) no SLC (Figura 2) depende de fatores como a microestrutura do arcabouço (porosidade, área superficial), solubilidade do fármaco, tipo de ligação entre o fármaco e a matriz e, o mecanismo de degradação da matriz. Para que uma substância possa ser empregada como carreador, ela deve ser capaz de incorporar o fármaco, retê-lo num sítio específico e liberá-lo progressivamente com o tempo (GINEBRA *et al.*, 2012).

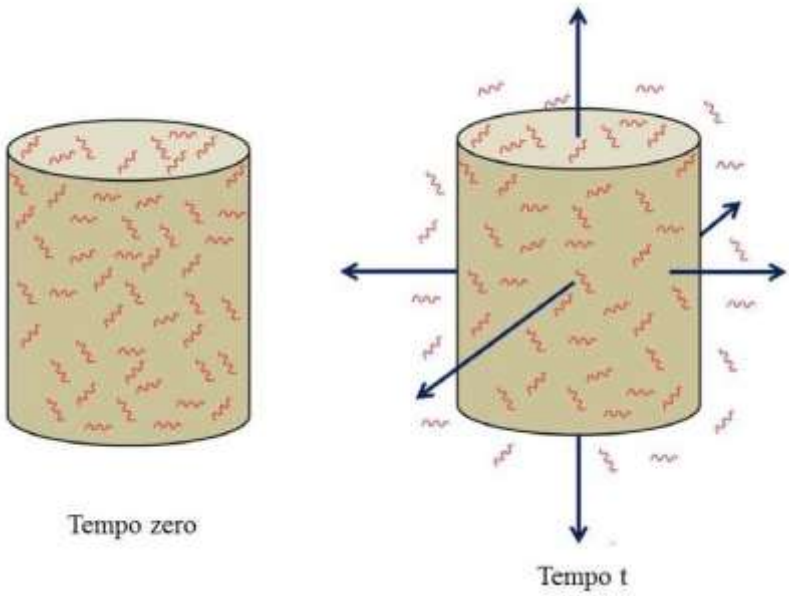


Figura 2: Esquema de liberação de fármacos em sistema de liberação controlada (Adaptada de BOSE E TARAFDER, 2012).

Os polímeros, as biocerâmicas e os compósitos têm se destacado no uso como arcabouços e em SLC aplicados na engenharia tecidual. O conhecimento das propriedades físico-químicas e da química de superfície desses biomateriais é fundamental para um bom entendimento sobre a interação biomaterial-célula no arcabouço (CGEE, 2010; TABATA, 2009).

Na tentativa de reproduzir os órgãos e tecidos do corpo humano sem causar prejuízo no desempenho de suas funções, esses biomateriais podem ser implantados em diferentes partes do corpo, como no crânio, cérebro, olhos, ouvido, mandíbula, traqueia, coração, seios, pulmão, fígado, pâncreas, rins, medula espinhal, intestino, ureter, bexiga, uretra, osso, pele, cartilagem (O'BRIEN, 2011; SALTZMAN, 2004).

A Tabela 1 mostra os diferentes tipos de biomateriais, metálicos, cerâmicos e poliméricos empregados na área ortopédica.

Os implantes metálicos correspondem à primeira geração de biomateriais e são considerados materiais bioinertes, pois são tolerados pelo organismo e não provocam reações inflamatórias ou infecciosas no local da implantação (MOREIRA, 2006). Como implante ósseo, os implantes metálicos são empregados, principalmente, em próteses de quadril, fêmur e dentárias. Nesses casos, o implante deve ser compatível com a função a ser desempenhada, por isso, exige-se um material com alta resistência mecânica e à corrosão. Porém, na engenharia tecidual, os implantes metálicos têm como desvantagens não se degradarem, não formarem ligações estáveis com o tecido ósseo e sofrerem desgastes mecânicos (CAPUCCINI *et al*., 2008; LIU & MA, 2004).

A combinação de materiais com boa resistência mecânica e bioatividade surgiu com a segunda geração de biomateriais, onde são empregadas as cerâmicas, biovidros e os polímeros. Esses materiais são capazes de estabelecer a ligação com o tecido ósseo e, após certo tempo, sofrer degradação parcial promovendo assim, a osteointegração e a osteocondução e contribuindo para a regeneração natural do tecido (MOREIRA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Diversos materiais poliméricos, sintéticos ou naturais, têm sido empregados em ortopedia na fixação óssea por meio de hastes, pinos, parafusos e placas. Os materiais poliméricos são geralmente biodegradáveis e biocompatíveis. No entanto, eles possuem baixa

resistência mecânica e podem gerar reação tóxica pela liberação de produtos ácidos de degradação (NAVARRO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As biocerâmicas são aplicadas na regeneração do tecido ósseo, com o objetivo de reparar, substituir e reconstruir o tecido danificado. Na engenharia tecidual, as biocerâmicas que mais se destacam são os fosfatos de cálcio, devido à similaridade com a fase mineral óssea. Os fosfatos de cálcio, além de serem biocompatíveis, são também osteocondutores, permitindo a ligação química entre o material e o tecido, favorecendo o crescimento ósseo sobre a superfície do material ou entre ele. Entretanto, suas limitações estão relacionadas à natureza frágil e porosa do biomaterial, aumentando assim o risco de fraturas, sendo utilizados em regiões de baixo esforço mecânico (LIU, XIA, CZERNUSZKA, 2007).

No sentido de superar as desvantagens das biocerâmicas, os compósitos de polímeros e biocerâmicas foram introduzidos com o objetivo de produzir biomateriais mais resistentes do ponto de vista mecânico, com melhor adesão e integração com as células ósseas e que possuam taxas de degradação favoráveis à reconstituição do tecido. Na engenharia tecidual, a combinação entre biomateriais diferentes permite criar estruturas de tamanho, forma e composição de acordo com o interesse de aplicação do biomaterial.

Tabela 1: Biomateriais empregados na área ortopédica (NAVARRO, 2008).

Biomaterial	**Aplicação**
Aço inox 316, 316L, F318	Placas, parafusos
Liga de Co-Cr-Mo	Próteses
Liga de Ti recoberta com HA	Próteses de joelho e quadril, pinos de fixação
Ti6Al4V	Próteses
NiTi	Fixador de ossos longos, espaçador vertebral

Alumina	Próteses
Alumina padrão 6474	Implantes dentários
PSZ	Prótese de nariz, de maxilar, revestimento, preenchimento periodontal
Cimento R (Cimento de fosfato de cálcio)	Preenchimento em fenda palatina e região apical
Cimento H (Cimento de fosfato de cálcio)	Restaurações dentais, preenchimento periapical
Biopex (Cimento de fosfato de cálcio)	Preenchimento em defeitos ósseos
Bonesource (Cimento de fosfato de cálcio)	Reparação de grandes defeitos periodontais
Cimento D (Cimento de fosfato de cálcio)	Cirurgias periapicais
Biovidro 45S5.4F BG	Reconstrução maxilofacial
Biovidro 45B15S5 BG	Reconstrução do ouvido médio, implantes dentários
Biovidro 52S4.6 BG	Juntas vertebrais, dispositivos percutâneos
Ceravital KGy213	Reconstrução maxilofacial, implantes dentários
A/W GC	Dispositivo para próteses vertebrais
MB GC	Próteses da crista ilíaca
Poli (ácido metil metacrílico) (PMMA)	Cimentos ósseos, ancoramento de próteses
Polietileno (PE)	Próteses de joelho, revestimento de acetábulo
Poli(dimetilsufóxido) (PDMS)	Próteses para pequenas articulações de

	mãos e pés
Polipropileno (PP)	Dispositivo de fixação óssea
Polissulfona (PS)	Dispositivo de fixação óssea, próteses
Policarbonato (PC)	Dispositivo de fixação bioreabsorvível, enxerto para regeneração óssea, SLC
Poli (ácido glicólico) (PGA)	Dispositivo de fixação bioreabsorvível, enxerto para regeneração óssea, SLC
Poli (ácido láctico) (PLA)	Dispositivo de fixação bioreabsorvível, enxerto para regeneração óssea, SLC
Policaprolactona (PCL)	Dispositivo bioreabsorvível para regeneração óssea
Polidioxanona (PDS)	Dispositivo de fixação bioreabsorvível, enxerto para regeneração óssea

2.2 BIOCERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO

Atualmente, um dos grandes gastos em saúde pública se concentra em doenças e procedimentos cirúrgicos ortopédicos. Por esse motivo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) instituiu o período de 2000 a 2010 como sendo “A década do osso e da articulação” e adotou medidas de conscientização da população a respeito do problema (SES, 2011). Tendo em vista a demanda em busca de terapias e materiais que venham atender às necessidades da população e melhoria da saúde pública, os fosfatos de cálcio (CaP) têm sido muito estudados nos últimos 80 anos, especialmente, com ênfase no preenchimento ósseo.

Os fosfatos de cálcio têm sido amplamente utilizados nas áreas médica e odontológica devido a sua grande similaridade com a parte inorgânica da maioria dos tecidos calcificados do corpo humano (Tabela 2). Suas propriedades de biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade e inflamações, induzem a diferenciação das

células responsáveis pela formação óssea no sítio de implantação e promovem a formação ordenada e direcionada do osso novo sobre a superfície do biomaterial (GUASTALDI & APARECIDA, 2010; KAI, QIU *et al.*, 2006).

Tabela 2: Ocorrência de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Fosfato de Cálcio	Ocorrências
Hidroxiapatita (HA)	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário e urinário
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	Cálculo dentário e urinário
Fosfato octacálcico (OCP)	Cálculo dentário e urinário
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio diidratado (DCPD)	Cálculo dentário e ossos decompostos
Fosfato tricálcico (TCP)	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação de tecido mole
Pirofosfato de cálcio diidratado (CPPD)	Depósito de pseudo-gotas em fluido

Diversos tipos de fosfatos de cálcio são utilizados como biomateriais na reparação e substituição de tecidos ósseos como mostrado na Tabela 3. Eles apresentam composição química similar, mas se diferem na razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (Ca/P). A solubilidade em água do material é influenciada pela razão Ca/P e está relacionada diretamente com a taxa de biodegradação, que determina o tipo de aplicação e o comportamento *in vivo* do CaP (BOHNER, 2000).

Tabela 3: Principais CaP empregados como biomateriais (KAILI, LIN; CHENGTIE, WU; JIANG, CHANG, 2014).

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Razão Ca/P
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$Ca_xH_y(PO_4)_z.nH2O$, n = 3-4.5; 15-20% H_2O	1,20-2,20
Hidroxiapatita (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67
Hidroxiapatita cálcio-deficiente (CDHA)	$Ca_{10-x}(HPO4)_x(PO4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ $(0 < x < 1)$	1,50-1,67
Fosfato tricálcico (α-TCP e β-TCP)	$Ca_3(PO_4)_2$	1,50
Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$	1,33
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio diidratado (DCPD - Brushita)	$CaHPO_4.2H_2O$	1,00
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio anidro (DCPA - Monetita)	$CaHPO_4$	1,00
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$	0,50
Fosfato monocálcico anidro (MCPA)	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,50

Estudos demostram que quanto menor a razão Ca/P, mais solúvel é o material e mais facilmente ele se degrada em comparação à fase mineral óssea. Portanto, é possível ajustar a taxa de biodegradação dos CaPs a fim de que possam ser empregados na regeneração óssea como cimento, compósitos, revestimento, grânulos e blocos porosos.

Os fosfatos de cálcio também são empregados em outras áreas como adsorventes de metais e compostos orgânicos, catalisadores, suporte de catalisadores, condutores iônicos, sensores e em reforços mecânicos (KAILI, LIN; CHENGTIE, WU; JIANG, CHANG, 2014). Além de serem empregados como substituintes ósseos, são também usados como carreadores

em SLC, o que os torna favoráveis no tratamento de doenças, principalmente, os tumores ósseos que necessitam de terapias longas. Geralmente, a droga é incorporada ao CaP e o conjunto princípio ativo/carreador é adicionado a um veículo como, por exemplo, um polímero (CGEE, 2010). Dessa forma, há uma liberação progressiva da droga, no sítio de implantação, aumentando a eficácia do tratamento.

Dentre os CaP aplicados como biomateriais, a hidroxiapatita e o beta-fosfato tricálcico se destacam na aplicação médica como regeneradores ósseos devido à excelente resposta biológica. Estudos indicam que a hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico (β-TCP) apresentam boa atividade e afinidade biológica ao redor do tecido hospedeiro quando implantados (JONG-SHING, SZ-CHIAN, SAN-YUAN, 2004).

A HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, é o composto mais semelhante à fase mineral dos ossos e dentes (Ca/P = 1,67) e um dos mais insolúveis (Kps $=10^{-58.6}$) e estáveis fosfatos de cálcio. Devido à similaridade em composição química e estrutural com o componente inorgânico dos ossos e dentes, a HA é um dos principais biomateriais empregados em revestimentos e enxertos ósseos. Porém, a HA possui taxa de biodegradação lenta, sendo reabsorvida depois de 4 ou 5 anos de implantação e seu uso é limitado a regiões submetidas a baixos carregamentos mecânicos (BOANINI, GAZZANO, BIGI, 2010; CARBAJAL, CABALLERO, SAINZ, 20012)

O beta-fosfato tricálcico, β-$Ca_3(PO_4)_2$, também apresenta similaridades com a apatita biológica (Ca/P = 1,50) e é reabsorvível (Kps $=10^{-29,5}$). Essa característica se destaca frente à hidroxiapatita e confere a esse material, aplicações na área de substituição óssea, principalmente nas cirurgias orais e craniofaciais. A degradação do β-TCP acelera o processo de regeneração óssea, pois ele atua como indutor para a formação de novo osso, sendo gradualmente incorporado pelo novo tecido ósseo formado, apresentando uma biodegradação quase completa depois de um ano (LIANG, RULIS, CHING, 2010; PERERA *et al*., 2010).

Devido a suas características quanto à estabilidade cristalina e dissolução e, por possuir propriedades osteogênicas e proporcionar uma forte ligação com o tecido ósseo hospedeiro, o β-TCP tem sido muito empregado em sistemas de liberação controlada, principalmente, para liberação de fármacos empregados em quimioterapia, além de ser um

dos CaP mais empregados como substituto ósseo (VAHABZADEH, EDGINGTON, BOSE, 2013).

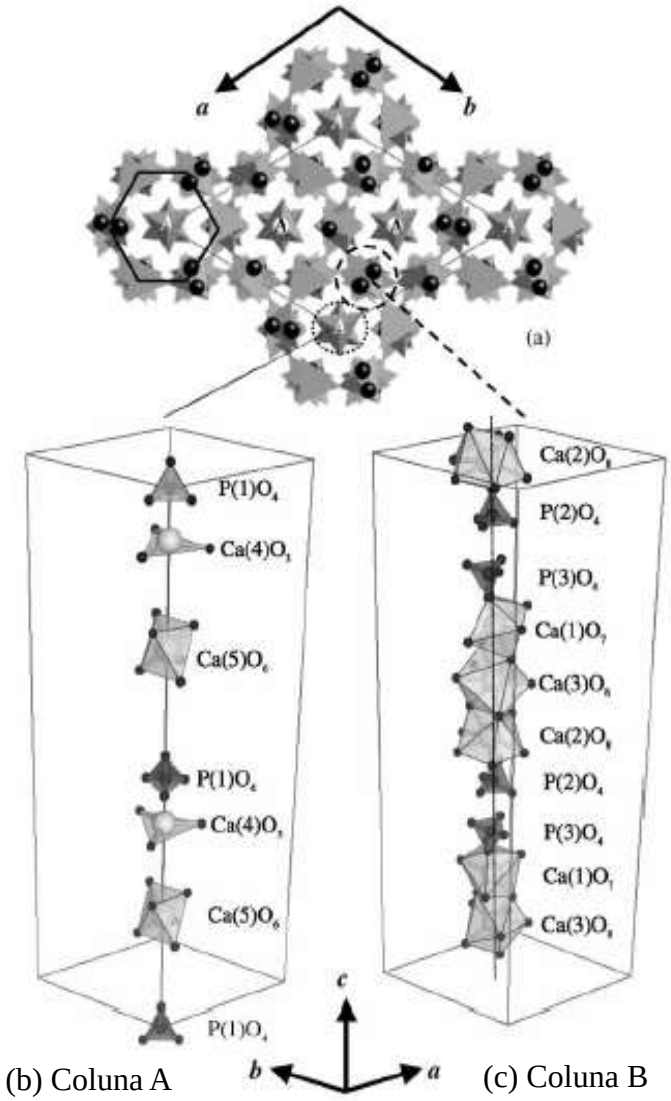
O beta-fosfato tricálcico se cristaliza num sistema romboédrico, segundo o grupo espacial R3c, com parâmetros de rede *a* e *c* iguais a 10,439 e 37,375 Å, respectivamente. Em sua estrutura, as unidades tetraédricas dos grupos PO_4 estão ligadas aos seis diferentes sítios de Ca. A estrutura cristalina do β-TCP (Figura 3) apresenta dois tipos de colunas, A e B, ao longo do eixo *c*. Cada coluna A é rodeada por 6 colunas B e cada coluna B é cercada por 2 colunas A e 4 colunas B. Os átomos da coluna B encontram-se distorcidos quando comparados com os da coluna A. É possível verificar que a estrutura cristalina do β-TCP é complexa e que essa divisão em colunas facilita o entendimento da distribuição dos átomos na rede (MASATOMO, YASHIMA *et al.*, 2003; YIN, STOTT, RUBIO, 2003).

O β-TCP é obtido pela reação em estado sólido ou conversão térmica em altas temperaturas, geralmente, de uma hidroxiapatita cálcio-deficiente e é estável termicamente até 1125 ^{o}C. Acima desta temperatura o β-TCP é convertido em α-TCP que possui propriedades físico-químicas diferentes do β-TCP (BOANINI, GAZZANO, BIGI, 2010; MASATOMO, YASHIMA *et al.*, 2003).

O método de obtenção dos fosfatos de cálcio é um fator importante, pois determina as propriedades físico-químicas do material produzido, como tamanho de cristal, porosidade, cristalinidade. Essas características afetam diretamente a solubilidade e, consequentemente, o comportamento *in vivo* das apatitas.

A estrutura do β-TCP permite substituições catiônicas em que os íons Ca^{2+} podem ser facilmente substituídos por Li^{+}, K^{+}, Na^{+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Zn^{2+}. Dentre as diversas possibilidades de substituições iônicas em sua estrutura, a substituição pelo íon Sr^{2+}, apresenta grande relevância (KANNAN *et al*., 2010) na formação óssea .

A inserção de um íon na estrutura da apatita causa alterações na sua estrutura e, consequentemente, nas suas características físico-químicas. Mudanças na solubilidade, estabilidade térmica, resistência mecânica, comportamento biológico, todos esses parâmetros são afetados com a substituição iônica.



(b) Coluna A (c) Coluna B

Figura 3: (a) Estrutura cristalina do β-TCP pela projeção no plano 001. (b) e (c) Configurações dos grupos CaO_n e PO_4 ao longo do eixo *c*. Configurações obtidas pelo software VCIS (Extraída de MASATOMO, YASHIMA *et al.*, 2003).

2.2.1 Substituições de Cálcio por Estrôncio em Fosfatos de Cálcio

Modificações na estrutura de um biomaterial têm sido propostas a fim de melhorar seu desempenho como substituinte ósseo. Em particular, a substituição de íons Ca por Sr tem grande interesse, pois o estrôncio tem um papel importante na mineralização dos tecidos.

Devido aos efeitos benéficos do Sr na remodelação óssea e pelo fato da rede cristalina da apatita permitir substituições, os estudos de incorporação deste íon na estrutura da apatita, cresceram nos últimos tempos.

O íon Sr^{2+} (raio iônico igual 1,12 Å) é ligeiramente maior que o íon Ca^{2+} (raio iônico igual 0,99 Å) (ROKIDI & KOUTSOUKOS, 2012). A entrada de Sr na rede da apatita provoca distorções na estrutura cristalina, alterações no parâmetro de rede (*a* e *c*) e mudanças no volume da célula unitária e densidade do material. Essa substituição causa um decréscimo da cristalinidade, devido a tensões estruturais causadas pelo tamanho maior do estrôncio. Esses defeitos na rede influenciam na cristalinidade, no tamanho de cristal, na estabilidade do material e na solubilidade (LAM *et al*., 2010).

A solubilidade do material aumenta devido aos defeitos estruturais causados pela entrada do íon estrôncio na rede da apatita. Assim, um aumento no teor de Sr acarreta em uma maior dissolução dos cristais. Porém, outros pesquisadores mostraram que baixos teores de Sr provocam uma maior distorção na rede cristalina, induzindo a uma maior dissolução dos cristais (GUO-XIN, NI *et al*., 2011; WEIBIN, ZHANG *et al.*, 2011).

O tamanho de cristalito também é influenciado pela presença de estrôncio. Quanto maior o seu teor na rede cristalina, maior o tamanho de cristalito. Pesquisadores mostraram que há uma orientação preferencial para o crescimento dos cristais à medida que o teor de Sr^{2+} aumenta. Elevadas porcentagens de estrôncio acarretam em cristais na forma de agulhas (WEIBIN, ZHANG *et al.*, 2011).

Um estudo mais aprofundado sobre a incorporação de estrôncio na rede da apatita é importante a fim de proporcionar um melhor entendimento sobre o processo de biomineralização óssea. Dessa forma é possível prever e controlar algumas propriedades, a fim de que o material produzido possa ser empregado no tratamento de doenças ósseas.

2.3 ESTRÔNCIO E RANELATO DE ESTRÔNCIO

2.3.1 Importância do Estrôncio (Sr)

O estrôncio (Sr) é considerado um elemento traço, pois diante de outros íons, como por exemplo, o cálcio, ele se encontra em pequena quantidade no organismo. Cerca de 98% total de estrôncio está presente na fase mineral do osso, principalmente, nas regiões de alto *turnover* metabólico onde ocorre o processo de renovação e substituição das células ósseas (LI et al., 2007; ZREIQAT et al., 2010). O Sr está mais presente no osso trabecular quando comparado ao osso cortical e tem de 2 a 4 vezes maior quantidade no osso recém-formado que no osso antigo (NAVEAU, 2004; SAIDAK & MARIE, 2012).

Estudos revelam que o estrôncio aumenta a replicação dos pré-osteoblastos, induzindo a produção de osteoblastos, estimulando a formação óssea, ao mesmo tempo que inibe a diferenciação dos osteoclastos, diminuindo sua atividade e reduzindo, assim, a reabsorção óssea (Figura 4). Porém, o mecanismo do estrôncio na estrutura óssea ainda não está bem definido (ALKHRAISAT *et al.*, 2008; BIGI *et al.*, 2007; WEIBIN, ZHANG *et al.*, 2011).

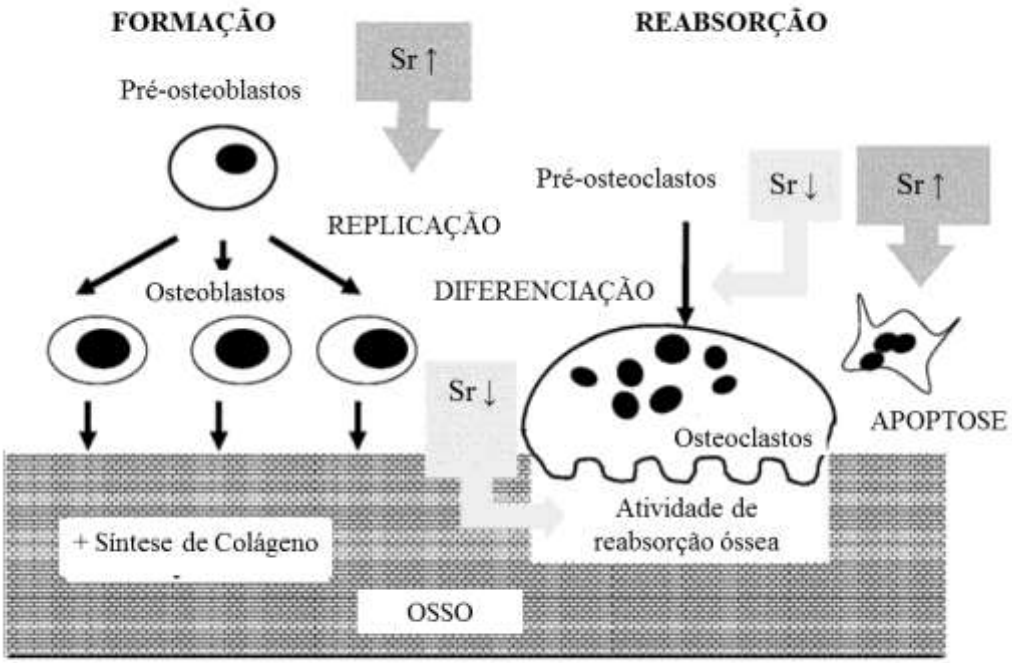


Figura 4: Atuação do estrôncio nos processos de formação e reabsorção óssea (Adaptada de MARIE, 2006).

Devido a sua similaridade com íons cálcio, principalmente no que se refere à carga iônica e tamanho, o íon Sr^{2+} pode ser incorporado facilmente na matriz óssea substituindo os íons Ca^{2+} na proporção de 1:10 (FORSGREN & ENGQVIST, 2010; ROKIDI & KOUTSOUKOS, 2012). A inserção de estrôncio na matriz óssea depende, principalmente, do sexo do paciente, do sítio esquelético, da sua concentração no sangue, da dose administrada e da duração do tratamento.

Por esse motivo, o estrôncio tem um papel fundamental no tratamento da osteoporose, que é caracterizada pela fragilidade e baixa massa óssea e risco de fraturas (ALKHRAISAT *et al.*, 2008; DAHL *et al.*, 2001; DAGANG, GUO *et al.*, 2005). Mesmo pequenas concentrações de Sr (2-10 µg/mL) são suficientes para ativar a formação óssea. No entanto, altas concentrações deste íon (20-100 µg/mL) podem ter efeito contrário, induzindo a desmineralização óssea, pelo fato dos íons Sr^{2+} substituírem os íons Ca^{2+} na apatita biológica (LANDI *et al.*, 2008; NIELSEN, 2004; SUGANTHI *et al.*, 2011).

Além de apresentarem similaridade química, no ponto de vista fisiológico, esses íons também agem de forma semelhante, tendo o mesmo caminho metabólico. Entretanto, cálcio e estrôncio apresentam comportamentos fisiológicos distintos no que se refere à contração muscular, coagulação sanguínea, absorção gastrintestinal, excreção renal, transferência placentária e secreção mamária. A principal diferença entre eles está relacionada com a absorção no organismo. Há uma competição entre a absorção de Ca e Sr no intestino. Como o Sr é maior, há uma menor absorção deste íon no intestino. Mesmo considerando que a quantidade de estrôncio diária ingerida por meio de alimentos e bebidas é em torno de 2 a 4 mg e que a de cálcio é de 1.000 mg, a excreção de estrôncio pela urina é em torno de três vezes maior que a de cálcio (BRONNER, 2008). Segundo NIELSEN (2004), há uma perda de estrôncio diária de 0,34 mg pela urina; 1,5 mg pelas fezes; 0,02 mg pelo suor e $0{,}2.10^{-3}$ mg pelo cabelo.

O estrôncio não é considerado um elemento essencial no organismo, como por exemplo, o zinco, mas uma dieta deficiente em estrôncio pode conduzir a um aumento de cáries dentárias e a uma desfavorável calcificação de ossos e dentes. A ingestão de estrôncio por meio de suplementos diários proporciona um aumento na densidade óssea mineral, diminuição do número de fraturas e redução da dor em pacientes com osteoporose. No entanto, o excesso desse elemento no organismo acarreta numa hipocalcemia e ao raquitismo.

Devido às suas semelhanças fisiológicas, o excesso de estrôncio provoca uma diminuição do metabolismo para o cálcio, levando a um aumento da excreção renal e menor absorção intestinal (NIELSEN, 2004).

2.3.2 Uso do Ranelato de Estrôncio (SrRan)

Devido aos efeitos benéficos do Sr no *turnover* metabólico ósseo, produtos contendo este íon têm sido empregados no tratamento da osteoporose, principalmente em mulheres na fase pós-menopausa.

A osteoporose é uma doença que altera a microarquitetura óssea devido ao desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (KEATING & STEVENSON, 2007; MARIE, 2006). Ela pode ser causada pela queda no nível de estrogênio, baixa absorção de cálcio e vitamina D, por algumas doenças autoimunes, genéticas, endócrinas, hematológicas e distúrbios alimentares, assim como uso contínuo de alguns medicamentos, como corticoides, anticonvulsivantes, heparina, ciclosporina A, retinóides orais. Todos esses fatores podem induzir à diminuição da densidade mineral óssea (DMO) conduzindo a uma fragilidade óssea e causar a osteoporose, aumentando assim o risco de fraturas (AZEVEDO, TAVARES, CHAHADE, 2013; DAHL, 2001; OSTEOPOROSE, 2011).

O tratamento para osteoporose inclui medicamentos como bisfosfonatos, moduladores seletivos de receptor de estrogênio (SERMs), calcitonina, hormônio da paratireoide (PTH), estrogênio, terapias de reposição hormonal, fluoretos, sais de estrôncio e suplementos de cálcio e vitamina D (CAMCIOGLU *et al*, 2009; DAHL *et al.*, 2001; KEATING & STEVENSON, 2007; NOF, 2011). O uso da medicação acompanhado de uma mudança no estilo de vida, como a prática de exercícios físicos e boa alimentação, ajudam a prevenir ou diminuir o progresso da doença.

Os medicamentos citados atuam, separadamente, no aumento da formação óssea ou na diminuição da reabsorção óssea. Nenhum deles age em ambos os processos. Os bisfosfonatos (BPs), como o alendronato, risendronato, ibandronato e ácido zoledrônico, a calcitonina, os SERM's, como tamoxifeno, raloxifeno e ormeloxifeno, os repositores hormonais, como a tibolona são conhecidos como drogas antirreabsortivas e atuam na atividade osteoclástica,

diminuindo lentamente a reabsorção óssea. Dessa forma, esses medicamentos agem aumentando a DMO com redução do risco às fraturas, principalmente, de quadris e coluna após dois anos de uso contínuo (BUSSE *et al.*, 2010; KEATING & STEVENSON, 2007; NOF, 2011; REGINSTER & MEUNIER, 2003).

Entretanto, estudos mostram algumas desvantagens no tratamento da osteoporose em mulheres pós-menopausa com uso dos bisfosfonatos. Pode ocorrer o aparecimento de dores musculares e nas articulações; como as drogas são de difícil absorção, podem causar náusea, azia, esofagite e úlcera gástrica (NOF, 2011). Pesquisas revelam o aparecimento de osteonecrose mandibular em pacientes tratados com BPs, principalmente o intravenoso, e que foram submetidos a uma exodontia ou uma cirurgia maxilar, como a inserção de implante. Os BPs inibem as funções osteoclásticas e conduzem a apoptose dos osteoclastos. Essa característica leva a uma diminuição da reabsorção óssea, mas também pode influenciar no *turnover* metabólico do osso prejudicando a homeostase óssea. Esse desequilíbrio ósseo pode gerar danos fisiológicos locais, posterior infecção e morte do tecido (BOFF *et al.*, 2014; LERMAN *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2004). Estudos em animais também revelaram que a diminuição da remodelação óssea em longo prazo prejudica o reparo de micro lesões e diminui a elasticidade óssea (MARIE, 2006).

As drogas anabólicas, como o fluoreto e o PTH, atuam de forma diferente que as drogas antirreabsortivas. Elas agem aumentando as taxas de formação óssea e, consequentemente, aumentam a DMO, diminuindo a incidência de fraturas em mulheres pós-menopausa e em homens com osteoporose (NAVEAU, 2004). A teriparatida, um exemplo de PTH, estimula a ação e formação dos osteoblastos. O PTH tem como função manter a homeostase do cálcio no organismo. Quando a concentração sérica de cálcio diminui, há um aumento da produção e secreção do PTH pelas glândulas paratireoides. Quando ocorre um aumento da concentração de cálcio, há uma inibição da liberação do PTH, que diminui a absorção de cálcio no intestino e aumenta sua excreção pelos rins (KEATING & STEVENSON, 2007). Porém, estudos mostraram que o uso contínuo desse tipo de medicamento conduziu a um maior número de casos de osteossarcoma em ratos e, por isso, o tratamento deve ser realizado em no máximo dois anos. Além disso, esse tipo de tratamento é dispendioso, ficando inviável sua aplicação por longo tempo (KEATING & STEVENSON, 2007; NOF, 2011).

Por esse motivo, o emprego de sais de estrôncio cresceu como alternativa para o tratamento da osteoporose. Alguns sais de Sr, como por exemplo, cloreto, lactato e malonato de estrôncio, têm sido administrados oralmente no tratamento da osteoporose. Outros sais, como o carbonato e citrato de estrôncio, também foram estudados como suplementos, mas seus usos não foram satisfatórios nos requisitos para regulamentação de medicamentos (BLAKE *et al.*, 2007). Porém, nos Estados Unidos e Canadá, esses sais de estrôncio são comercializados em farmácias e lojas de produtos naturais como suplemento alimentar, sem necessidade de receita médica, mesmo sem o conhecimento de como esses medicamentos agem no organismo (WOHL *et al.*, 2013).

Estudos sobre outro sal de estrôncio, o ranelato de estrôncio (SrRan), mostram que este medicamento atua tanto na estimulação da formação óssea quanto na inibição do processo de reabsorção. O Ranelato de Estrôncio (Protelos®) foi desenvolvido pelo Laboratório Servier na França em 2004 como uma nova droga anti-osteoporótica capaz de atuar em ambos os processos que influenciam o metabolismo ósseo. Essa característica de dupla ação do SrRan melhora a microarquitetura, aumentando a DMO e a força óssea tanto do osso trabecular quanto do osso cortical (BOIVIN, DOUBLIER, FARLAY, 2012; MARIE, 2005; REGINSTER *et al.*, 2009). Dessa forma, os portadores de osteoporose ficam menos sucessíveis a fraturas, principalmente, as do colo do fêmur.

O ranelato de estrôncio foi licenciado para uso na Europa, Austrália, Brasil e em alguns outros países, mas não no Canadá e Estados Unidos (BLAKE & FOGELMAN, 2007). Ele foi escolhido entre diversos tipos de compostos de estrôncio devido à biodisponibilidade do Sr (em torno de 25% após ingestão), tolerabilidade gástrica e características físico-químicas deste elemento no organismo. Depois de 3 a 5 horas após sua ingestão, os níveis plasmáticos de estrôncio atingem o máximo. A Figura 5 mostra a estrutura química do SrRan que é composto por dois átomos de Sr combinados a uma molécula de ácido ranélico, cuja nomenclatura oficial é um sal 5-[bis(2-óxido-2-oxoetil)amino]-4-ciano-3-(2-óxido-2-oxoetil)tiofeno-2-carboxilato diestrôncico (SWAMI, PISHAWIKAR, MORE, 2012).

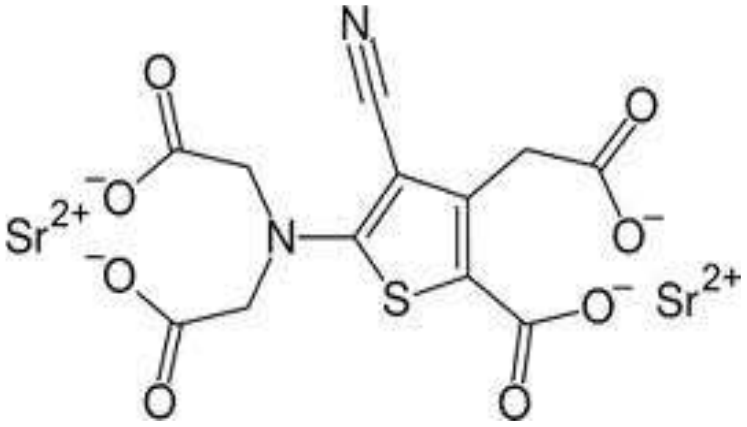


Figura 5: Estrutura química do ranelato de estrôncio (SWAMI, PISHAWIKAR, MORE, 2012).

Atualmente, o SrRan têm sido empregado como suplemento diário em dose oral (sachê de 2g dissolvido em água) no tratamento para osteoporose. O processo de remodelação óssea envolve um balanço entre a formação óssea, ativada pelos osteoblastos e a reabsorção óssea, controlada pela ação dos osteoclastos.

Os osteoblastos são derivados das células estromais mesenquimais e são expressos pelos níveis de fosfatase alcalina (ALP) e outras proteínas não-colagenosas, como a sialoproteína óssea (BSP) e a osteocalcina (OCN). Os osteoclastos são células multinucleadas de origem hematopoiéticas formados a partir da ativação do ligante do receptor de fator nuclear k-B (RANKL) e pelo fator estimulador das colônias de macrófagos (M-CSF). A osteoprotegerina (OPG) é um receptor do RANKL e tem a função de regular sua ação, diminuindo a diferenciação dos osteoclastos. O mecanismo de ação do *turnover* ósseo é então mediado pelo CaSR e RANK/RANKL/OPG (Figura 6), sendo o CaSR um receptor extracelular de membrana sensível a cálcio que se encontra presente nas células ósseas (BONNELYE *et al.*, 2008).

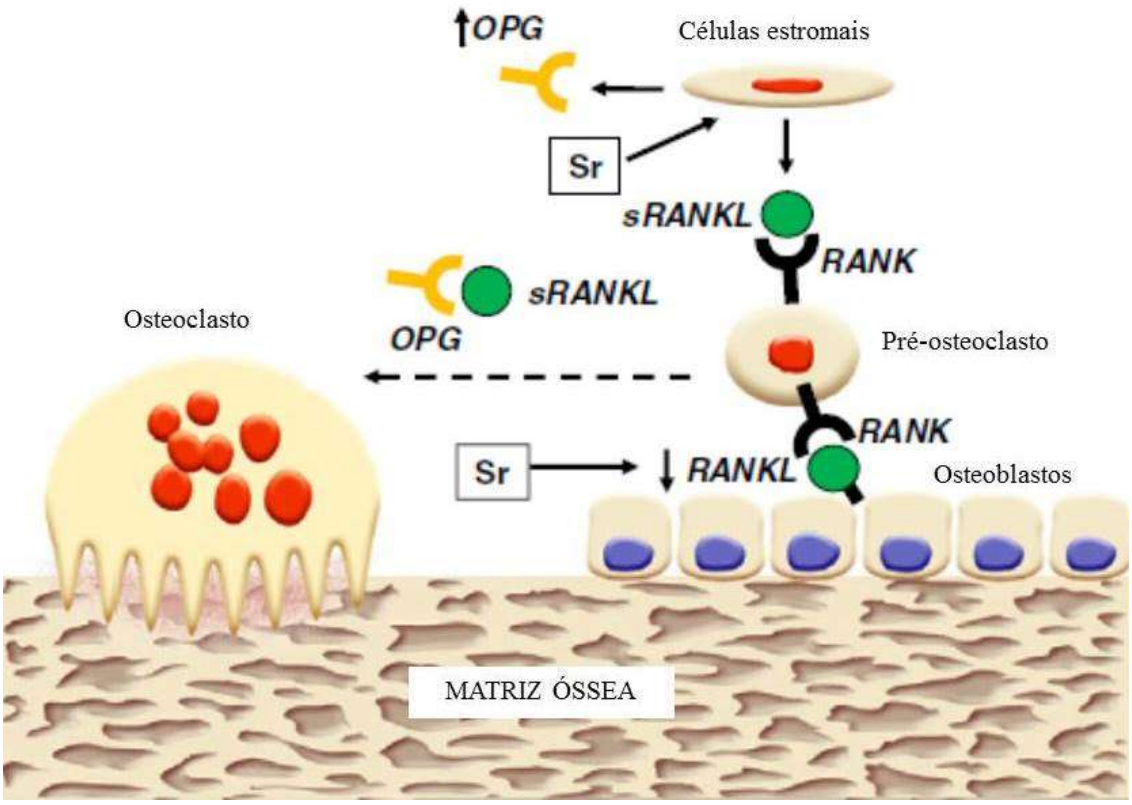


Figura 6: Processo de remodelação óssea mediada por RANK/RANKL/OPG (Adaptada de SAIDAK e MARIE, 2012).

A Figura 7 mostra que o estrôncio promove a replicação, diferenciação e sobrevida do osteoblasto através da ativação do CaSR, resultando num aumento da osteoblastogênese. Assim como, o Sr também ativa o CaSR reduzindo a diferenciação, atividade e sobrevida dos osteoclastos, diminuindo a reabsorção óssea.

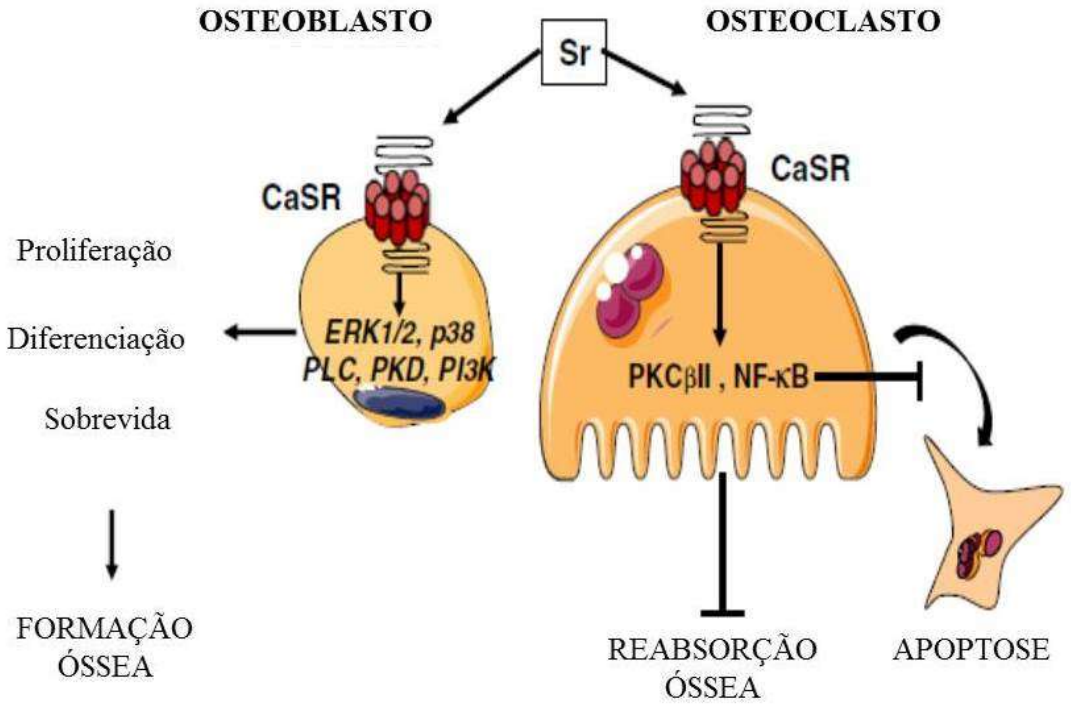


Figura 7: Efeito do estrôncio na ação do receptor sensível de cálcio (CaSR) nos processos de formação e reabsorção óssea (Adaptado de SAIDAK e MARIE, 2012).

O SrRan inibe em 30% a atividade osteoclástica, pois diminui a diferenciação dos osteoclastos, reduzindo a reabsorção óssea. Dessa forma, o SrRan inibe a perda óssea trabecular ocasionada pela deficiência de estrogênio que é o caso das mulheres pós-menopausa. Esse medicamento mostrou prevenir e restaurar parcialmente a perda óssea causada pela deficiência de estrogênio em ratos imobilizados. Altas doses de SrRan (1800 mg/kg/dia ou 8,75mmol Sr/kg/dia) induz a apoptose dos osteoclastos e o mecanismo de ação é mediado pelo receptor extracelular de membrana sensível a cálcio (CaSR) expresso nos osteoclastos, uma vez que o Sr ativa as células do CaSR (MARIE, 2005; MARIE, 2006).

O SrRan também aumenta a replicação celular dos pré-osteoblastos (também mediada pelo CaSR), a diferenciação dos osteoblastos, a atividade das células funcionais e a síntese da matriz óssea. Estimula a síntese de colágeno, aumentando assim a formação óssea. Aumenta a atividade da fosfatase alcalina e diminui a excreção da hidroxiprolina (MARIE, 2006).

A administração de SrRan em ratos normais (225-900 mg/kg/dia ou 0.88-3,51 mmol Sr/kg/dia durante 104 semanas) aumentou a espessura e diminuiu a separação trabecular na tíbia. Este efeito em ratos normais resultou num aumento do volume trabecular e, consequentemente, da massa óssea para o fêmur e para a vértebra da lombar. O SrRan melhorou a resistência óssea, pois tem efeito na força do osso e preveniu a perda óssea em ratos ovariectomizados e imobilizados. É importante ressaltar que estudos empregando ranelato de cálcio não tiveram os mesmos efeitos benéficos quanto ao ranelato de estrôncio (MARIE, 2006).

A administração de SrRan não afeta o perfil mineral nem o processo de mineralização óssea. O Sr é adsorvido na superfície do osso e uma pequena quantidade é incorporada, não alterando os parâmetros da rede cristalina da apatita óssea. Estudos em ratos intactos mostrou que o emprego de SrRan por 2 anos provocou um aumento das dimensões e massa do osso trabecular e cortical, melhoria da microarquitetura óssea garantindo uma maior resistência à carga, elevada qualidade óssea e assim, a uma melhor propriedade mecânica (AMMANN *et al.*, 2004).

Portanto, o uso terapêutico do ranelato de estrôncio nos distúrbios ósseos tem se destacado devido às propriedades farmacológicas do estrôncio no que diz respeito à manutenção da microarquitetura e densidade e aos processos de reparo e cicatrização de fraturas ósseas.

2.4 COMPÓSITOS ALGINATO/FOSFATO DE CÁLCIO

A combinação de um biopolímero com fosfato de cálcio tem sido investigada por muitos autores com o objetivo de produzir um material mais similar com o tecido ósseo. Considerando a própria matriz óssea, ela é constituída pela combinação de um polímero natural, o colágeno, com um mineral, a apatita (FANGFANG, SUN; HONGJIAN, ZHOU; JAEBEOM, LEE, 2011). Diferentes biopolímeros, sintéticos ou naturais, têm sido utilizados na fabricação desses compósitos, como colágeno, quitosana, gelatina, alginato, dentre outros (Tabela 4) (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004; CHAN-HEN, CHEN *et al.*, 2011).

Tabela 4: Polímeros biodegradáveis usados na engenharia tecidual como *scaffolds* e em sistemas de liberação controlada (SLC) (TABATA, 2009).

Polímero Sintético	Polímero Natural
Poli(L-ácido lático) (PLLA)	Colágeno
Poli(ácido glicólico) (PGA)	Gelatina
Poli(e-caprolactona) (LCA)	Fibrina
Copoli(LL-GA)	
Copoli(LL-CA)	Ácido hialurônico[a]
Copoli(LLA-EG)	Alginato[a]
Copoli(fumarato-EG)	Quitosana, quitina

[a] Não existem enzimas no organismo que degradem esses polímeros. Eles são "dissolvidos" por fluidos corpóreos.
EG – Etilenoglicol

Os biopolímeros são geralmente atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis. No entanto, apresentam problemas de imunogenicidade, podem produzir resposta inflamatória no local implantado, exibem baixa resistência mecânica e rápida degradação, o que torna seu uso limitado (NAVARRO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As biocerâmicas apresentam natureza frágil e porosa, pouca resistência ao desgaste, aumentando assim o risco de fraturas, sendo utilizadas em regiões de baixo esforço mecânico (LIU, XIA, CZERNUSZKA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Outro fator importante é que são necessários ajustes na forma da biocerâmica para que ela seja aplicada em determinado ambiente biológico, na forma de enxerto ósseo, por exemplo. Devido à falta de flexibilidade, as biocerâmicas são difíceis de moldar, limitando seu uso em certas aplicações (FANGFANG, SUN; HONGJIAN, ZHOU; JAEBEOM, LEE, 2011).

A vantagem da associação de um biopolímero com um material inorgânico, como argila, CaP, sílica e outros, é que o compósito formado apresenta propriedades otimizadas quando comparado ao uso isolado do material inorgânico ou do polímero.

Os compósitos apresentam forte interação eletrostática entre a parte orgânica e inorgânica, melhorando suas propriedades mecânicas. A maior resistência é dada pela fração inorgânica, enquanto que a tenacidade e plasticidade do compósito são devidas à parte orgânica. Segundo ZHANG, WANG, WANG (2010), microcápsulas de alginato/CaP apresentam maior resistência mecânica, promovem a nucleação e ativam as células ósseas quando comparadas ao uso somente do fosfato de cálcio.

O alginato está entre os diversos biopolímeros empregados na produção de arcabouços 3D. Ele tem sido utilizado em aplicações biomédicas e na bioengenharia devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade, baixo custo e propriedade de gelificação frente a cátions divalentes. Essas características conferem a este material ampla aplicabilidade, principalmente, como veículo polimérico de proteínas, fármacos ou células, e também como *scaffolds*, na forma de uma estrutura porosa, uma vez que apresentam semelhança estrutural com a matriz extracelular de tecidos vivos, podendo ser usado em sistema de liberação controlada (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004; CHAN-HEN, CHEN *et al.*, 2011; LEE & MOONEY, 2012). Na engenharia tecidual, o alginato também tem sido muito empregado na regeneração de cartilagens, pele, osso e fígado (LIN, SANG *et al.*, 2010).

Outra aplicação do alginato é na indústria de alimentos onde é empregado como estabilizante, espessante, emulsificante e material encapsulante. Por ser moldável, o alginato tem sido aplicado na indústria farmacêutica como material dentário na confecção de próteses, além de servir como agente de cobertura para feridas, estabilizador coloidal e dilatador sanguíneo. Em outros casos, o alginato vem sendo utilizado no tratamento de águas residuais como agente sequestrante de metais tóxicos (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004; GOH, HENG, CHAN, 2012; KASHIMA & IMAI, 2012).

O alginato é um polissacarídeo aniônico natural extraído de algas marinhas marrons. Estruturalmente, é um copolímero linear formado de unidades de ácido β-D-manurônico (M) e α-L-gulurônico (G) (Figura 8). Os monômeros estão alinhados na forma de blocos ao longo

da cadeia polimérica, com regiões homopoliméricas de MM e GG e, também com regiões de estrutura alternada dos blocos MG (MMM, GGG, MGMGMG) (XIE *et al.*, 2010; KASHIMA & IMAI, 2012; LEE & MOONEY, 2012). A proporção e a distribuição das unidades poliméricas, assim como o peso molecular influenciam nas propriedades do polímero, como por exemplo, na afinidade por cátions, propriedade de gelificação e rigidez (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004; GOH, HENG, CHAN, 2012; LEE & MOONEY, 2012).

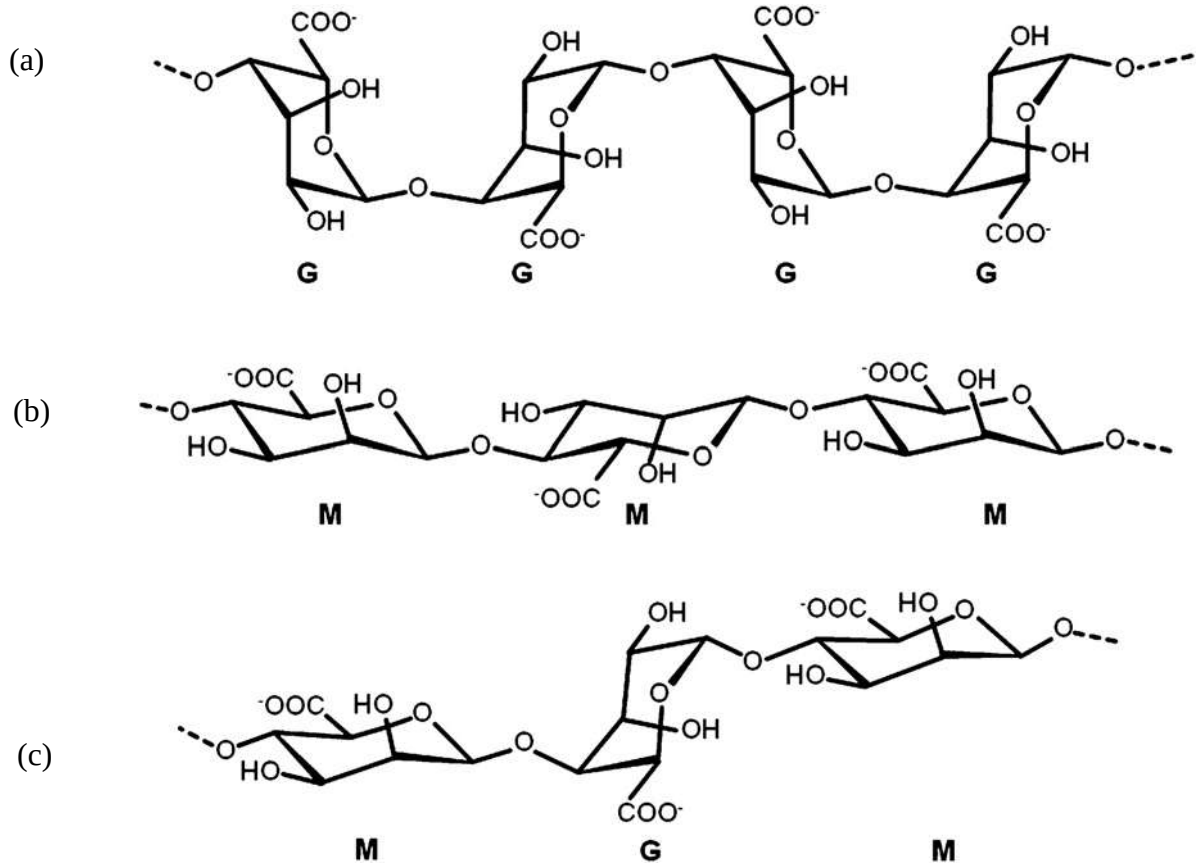


Figura 8: Estrutura dos homopolímeros que constituem a molécula de alginato. (a) Sequência em bloco de unidades G, (b) Sequência em bloco de unidades M e (c) Sequência alternada de unidades MGM (Extraída de LEE e MOONEY, 2012).

Uma das características do alginato é ser solúvel em água quando está ligado a cátions monovalentes, como o Na^{+} e, formar um gel insolúvel, quando se liga a cátions divalentes, como o Ca^{2+}. Esses cátions interagem preferencialmente com a unidade G e formam uma ligação cruzada entre as cadeias poliméricas adjacentes estabilizando o polímero (DE PAULA *et al.*, 2009; KASHIMA & IMAI, 2012). GOH, HENG, CHAN (2012) dizem que cátions

divalentes se ligam preferencialmente às unidades G enquanto que cátions trivalentes (La^{3+}, Pr^{3+}, Nd^{3+}) podem se ligar tanto às unidades G quanto as M.

A afinidade do alginato por cátions polivalentes é que determina a propriedade de gelificação que é descrita de acordo com o modelo de "egg-box" (Figura 9). Nesse modelo, os cátions polivalentes estão ligados coordenadamente com as carboxilas dos ácidos gulurônicos. Há uma interação eletroestática entre os cátions da solução reticulante e os ânions carboxilatos da unidade G, enquanto que o restante da cadeia do alginato se mantém por forças de van der Waals resultando em uma rede de gel tridimensional. A composição do alginato em termos de unidades de M ou G e sua concentração influenciam nas propriedades mecânicas do gel formado. Alginatos que possuem maior porcentagem de blocos G formam géis mais fortes, porém quebradiços. Entretanto, alginatos com predominância de blocos M ou alternados (MG), formam géis mais fracos, porém elásticos (XIE *et al*., 2010; FU *et al.*, 2011; KLEINBERGER *et al.*, 2013).

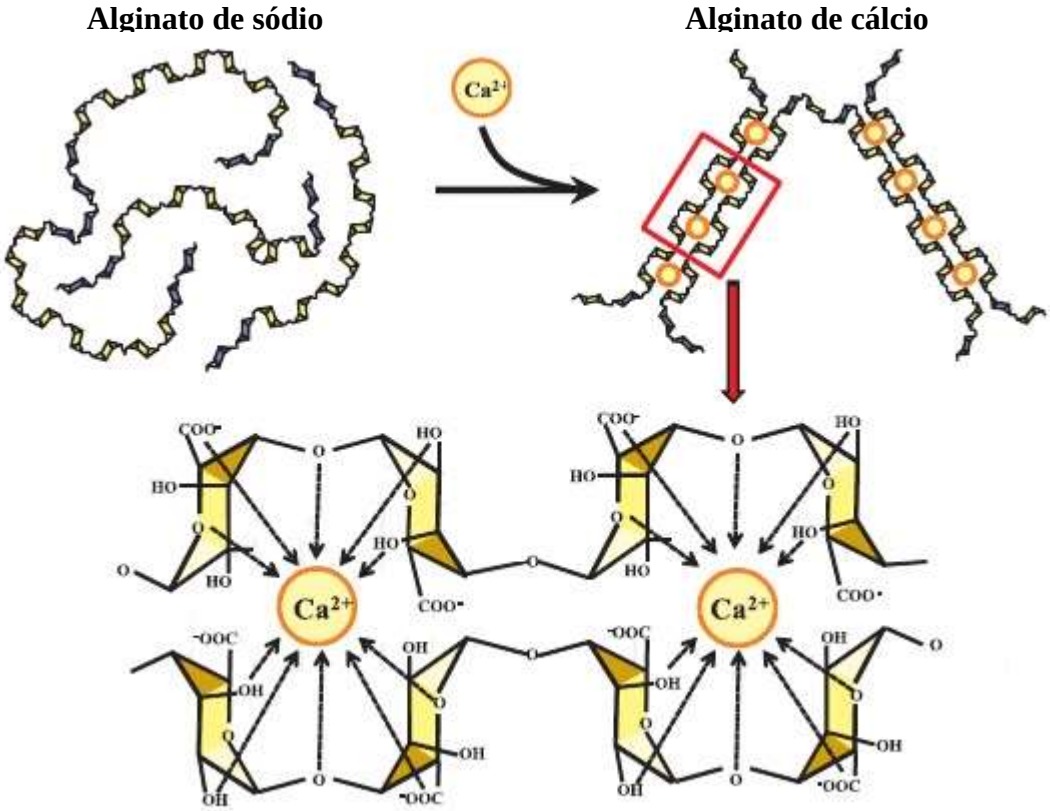


Figura 9: Modelo de "egg-box" do alginato de cálcio (KASHIMA e IMAI, 2012).

Na produção de géis, quanto maior a concentração de alginato, maior é a viscosidade da solução. Assim, as moléculas do polímero têm dificuldade de se rearranjar para formar ligações cruzadas estáveis (KUO & MA, 2001). Dessa forma, há produção de géis mais fracos e, consequentemente, com menor estabilidade mecânica.

Os cátions di ou trivalentes são chamados de agentes reticulantes e apresentam diferentes afinidades pelo alginato influenciando o processo de gelificação. A taxa de gelificação é um fator importante, pois influencia nas características do gel formado. Uma gelificação lenta produz géis mais uniformes e com maior estabilidade mecânica (PLACE *et al.*, 2011; LEE & MOONEY, 2012; KAKLAMANI *et al.*, 2014). MØRCH *et al* (2006) relatam que a afinidade do alginato diminui na seguinte ordem: Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn. Quando a solução reticulante apresenta íons com grande afinidade pelo alginato, há formação de esferas heterogêneas onde as paredes são densas e o núcleo difuso (KLEINBERGER *et al.*, 2013).

Sabe-se que o agente reticulante mais empregado é o íon Ca^{2+} por ser clinicamente seguro, enquanto que os íons Sr^{2+} e Ba^{2+} são considerados de baixa toxicidade. O íon Zn^{2+} é pouco usado como agente reticulante devido à sensibilidade das células beta do pâncreas a esse íon (JAY & SALTZMAN, 2009). Além do tipo do agente gelificante, sua concentração também é importante quando se trata de propriedades mecânicas. Quanto maior a concentração a solução reticulante, maior é o grau de reticulação, devido ao aumento da atração eletrostática entre as carboxilas presentes no alginato com os íons M^{2+} da solução reticulante. Com base nas propriedades citadas é possível fabricar géis de acordo com o perfil de interesse, de modo que possuam características adequadas ao local da sua aplicação.

Essa propriedade de formação de gel tem sido aproveitada na engenharia tecidual, onde os géis fabricados são empregados como veículos no transporte de células, curativos de feridas, na imobilização de células, proteínas e enzimas, órgãos artificiais e em sistemas de liberação controlada (CABALLERO *et al.*, 2013; KAKLAMANI *et al.*, 2014). Estudos mostram que compósitos de alginato/CaP têm sido empregados em SLC onde um fármaco ou fator de crescimento são encapsulados em esferas do compósito (XIE *et al.*, 2010).

A produção de microesferas de alginato pode ser realizada por vários métodos: emulsificação, pulverização aérea e extrusão (SHI *et al.*, 2011). O método de extrusão é um

processo simples, fácil de ser realizado e controlado, trabalha-se na temperatura ambiente, é livre de solventes orgânicos e produz microesferas de tamanho e distribuição regulares (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004; SHI *et al.*, 2011).

O método de extrusão consiste no gotejamento, por meio de uma seringa, de uma solução de alginato de sódio em uma solução reticulante, como mostrado na Figura10. Nesse caso, quando a gota de alginato de sódio encontra a solução de cloreto de cálcio, $CaCl_2$, os íons Na^+ são trocados pelos íons Ca^{2+} e então, ocorre o encapsulamento, formando instantaneamente as microesferas (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004; GOH, HENG, CHAN, 2012).

Porém, esse método pode produzir esferas de diferentes diâmetros no qual são influenciadas pela concentração e viscosidade da solução de alginato, velocidade de extrusão, diâmetro da agulha por onde passa a solução de alginato e distância da ponta da agulha à solução reticulante. De um modo geral, esferas maiores são produzidas quando se tem uma distância maior entre a solução de alginato e a solução reticulante; quando a concentração e viscosidade da solução de alginato é elevada; lenta velocidade de gotejamento e maior diâmetro da agulha (GOH, HENG, CHAN, 2012).

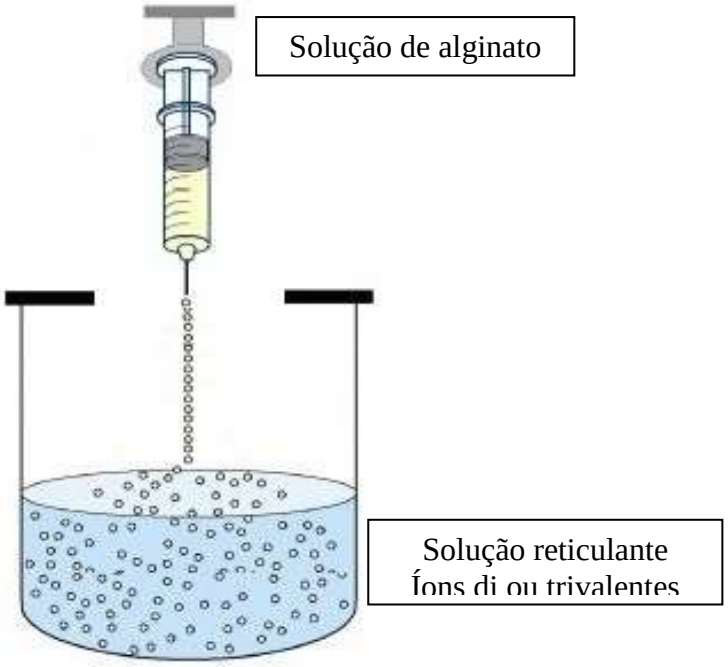


Figura 10: Esquema representativo do sistema de extrusão para formação de microesferas de alginato.

Outro processo empregado para a fabricação de microesferas de alginato é por via de um gerador eletrostático que funciona por diferença de potencial elétrico (XIE *et al*., 2010). É um processo mecanizado que independe da força aplicada na extrusão.

Do ponto de vista de um arcabouço 3D usado na engenharia tecidual, a forma esférica apresenta vantagens em relação a outras formas, pois facilita o transporte de massa pela difusão de nutrientes e de proteínas uniformemente. O tamanho micro das esferas (100 a 500 μm) também tem vantagens uma vez que elas podem ser implantadas perto da corrente sanguínea facilitando a oxigenação do tecido (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

O processo de gelificação é reversível e o gel de alginato formado não é estável fisiologicamente em períodos extensos. Ao longo do tempo, ocorre a ruptura das ligações cruzadas presentes nas esferas, liberando o cátion encapsulado para a solução. O mesmo processo ocorre se esferas de alginato permanecerem em contato com uma solução de citrato de sódio ou tampão de fosfato a um pH igual a 7,0. Nesse caso, há um aumento no grau de inchamento e uma rápida desintegração da matriz de alginato (GOH, HENG, CHAN, 2012; LEE & MOONEY, 2012). Esses agentes funcionam como quelantes e sequestram o cátion, muitas vezes o cálcio, da matriz de alginato conduzindo à ruptura da esfera (MØRCH *et al*., 2006; BIDARRA, BARRIAS, GRANJA, 2014).

Devido ao fato das esferas de alginato apresentarem alta taxa de difusão, essa característica confere a elas uma baixa eficiência de encapsulamento e limitado controle na cinética de liberação de fármacos. Por esse motivo, modificações têm sido propostas a fim de melhorar as propriedades das esferas de alginato para que elas sejam empregadas como matriz na encapsulação de fármacos (HONG-RU, LIN *et al.*, 2011; PAWAR & EDGAR, 2012).

2.5 TESTES *IN VITRO* E DISSOLUÇÃO DOS FOSFATOS DE CÁLCIO

Os processos de degradação *in vitro*, principalmente os dinâmicos, que mimetizam o fluido corpóreo, tem sido muito estudados, pois refletem, em parte, o comportamento *in vivo* do biomaterial na forma de arcabouço para regeneração óssea. Esses ensaios *in vitro* permitem avaliar as modificações que ocorrem com o biomaterial e o meio e que podem ser extrapoladas para prever o comportamento entre o implante e o tecido ao seu redor.

A norma ISO 10993-9 (1994) descreve o ensaio de degradação a que o biomaterial deve ser submetido, de modo que os produtos decorrentes desse teste possam ser analisados. A ISO 10993-9 (1994) considera que os produtos de degradação gerados através do ensaio são provenientes somente da interação química do biomaterial com o fluido. Nos testes de degradação *in vitro*, o biomaterial a ser analisado é colocado imerso num fluido específico, sob condições de pH e temperatura controlados. Em intervalos de tempos, o fluido e o biomaterial são analisados a fim de avaliar as modificações a que foram submetidos.

Os testes de degradação envolvem mecanismos de dissolução, precipitação, adsorção e outras características de superfície da interface biomaterial-fluido, com o objetivo de avaliar o potencial de degradação e o desempenho do biomaterial. Para fazer este tipo de avaliação é preciso conhecer as características físico-químicas e a morfologia da superfície do biomaterial. Essas propriedades são dependentes da composição química (razão Ca/P), solubilidade, tamanho de cristal, porosidade, bem como, do pH do meio fisiológico (LIMA, 2006; SILVA, 2009). A Figura 11 mostra algumas das propriedades dos CaPs que podem influenciar os processos biológicos como a adsorção de proteínas, adesão e diferenciação celular.

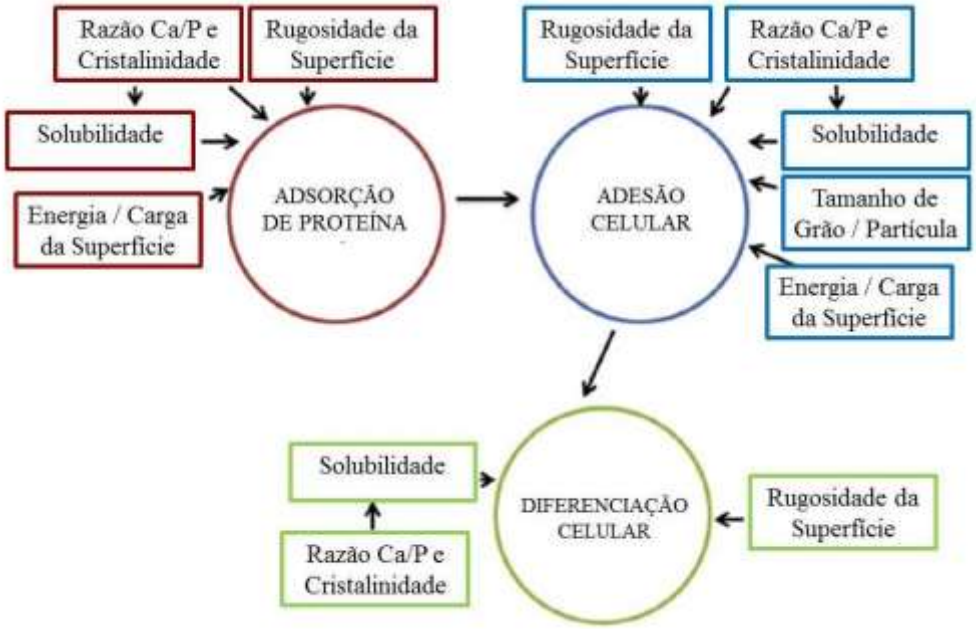


Figura 11: Fatores que influenciam os processos de adsorção de proteínas, adesão e diferenciação celular (Adaptada de SAMAVEDI, WHITTINGTON, GOLDSTEIN, 2013).

A dissolução dos fosfatos de cálcio em meio fisiológico ocorre de acordo com a solubilidade correspondente de cada um. A solubilidade segue a ordem: α-TCP >> CDHA > β-TCP >> HA, o que implica numa maior taxa para o α-TCP e menor taxa de degradação para a HA. Dependendo do local onde o implante é aplicado, deseja-se que a taxa de degradação e substituição sejam lentas, como é o caso de uma cranioplastia. Em outros casos, como reparos periodontais e enxertos sinusais, há a necessidade de uma rápida degradação do implante (CHOW, MARKOVIC, TAKAGI, 2003).

Por esse motivo, materiais compostos por β-TCP tem se destacado como regeneradores ósseos, pois uma vez implantado, o β-TCP se dissolve e os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} presentes no meio se depositam na superfície do material favorecendo a formação de uma nova apatita. Essa camada de apatita promove a adesão dos osteoblastos e a formação óssea, dando início ao processo de regeneração (CARBAJAL, CABALLERO, SAINZ, 2012; SÁNCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2009).

A dissolução dos fosfatos de cálcio é facilitada em meio ácido, uma vez que baixos valores de pH promovem a degradação do CaP (DOROZHKIN, 2002). No caso do β-TCP, quando o material entra em contato com o tampão em pH 5,0, ocorre a seguinte reação:

$$Ca_3(PO_4)_2 \rightarrow 3Ca^{2+} + 2PO_4^{3-} \qquad \text{(Equação 2.1)}$$

Inicialmente, ocorre a dissolução da camada superficial das partículas de β-TCP, liberando os íons Ca e PO_4 para o meio, o que ocasiona uma elevação do pH. Quando a solução atinge o equilíbrio, inicia-se outro processo, o de reprecipitação de uma nova fase de fosfato de cálcio. Segundo ZOU *et al*. (2011), podem acontecer as reações:

$$H^+ + PO_4^{3-} \longrightarrow HPO_4^{2-} \qquad \text{(Equação 2.2)}$$

$$H^+ + HPO_4^{2-} \longrightarrow H_2PO^{4-} \qquad \text{(Equação 2.3)}$$

$$H^+ + H_2PO_4^{-} \longrightarrow H_3PO_4 \qquad \text{(Equação 2.4)}$$

A presença desses íons em solução pode promover a formação da brushita ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$):

$$Ca^{2+} + HPO_4^{2-} + 2H_2O \rightarrow CaHPO_4 \cdot 2H_2O \qquad \text{(Equação 2.5)}$$

Como a concentração dos íons PO_4^{3-} diminui no meio, o pH volta a subir até que a solução atinja mais uma vez o equilíbrio. Essa é apenas uma das possíveis reações que podem ocorrer para a formação de uma nova fase apatítica. Porém, o mecanismo de dissolução dos fosfatos de cálcio é ainda complexo, envolvendo diversas reações de superfície que ocorrem simultaneamente (QUAN, LIU, 2014).

De um modo geral, a taxa de dissolução dos CaPs aumenta de acordo com a diminuição de cristalinidade, presença de defeitos na rede cristalina, tamanho de cristal pequeno, área superficial elevada e substituições iônicas como a entrada de Sr^{2+}, Mg^{2+}, CO_3^{2-} (FULMER *et al.*, 2002; RIBEIRO, 2003).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A demanda por produtos que auxiliem na regeneração óssea tem aumentado ao longo das últimas décadas e deve continuar crescendo dado ao aumento de acidentes por trauma e violência. O desenvolvimento de biomateriais sintéticos à base de fosfatos de cálcio para substituição e regeneração óssea, juntamente com o efeito benéfico do íon estrôncio (Sr) e seu uso na forma de Ranelato de Estrôncio (SrRan), despertou o interesse na produção de materiais de enxerto que possam ser usados para este fim. Uma opção promissora é a incorporação do íon estrôncio em uma única rota de produção às microesferas do compósito alginato/beta-fosfato tricálcico para posterior liberação local de estrôncio no sítio implantado. A produção das microesferas pelo método de extrusão empregando cloreto de estrôncio ($SrCl_2$) e ranelato de estrôncio como agente gelificante é a inovação desse trabalho, uma vez que o processo convencional emprega o cloreto de cálcio como agente de gelificação. Dessa forma, o $SrCl_2$ e o SrRan teriam dupla função: seriam a fonte de estrôncio e o agente gelificante. As microesferas contendo SrRan, além de disponibilizar o íon Sr, o fármaco poderia ajudar no controle da resposta inflamatória decorrente da implantação do biomaterial, com uma menor possibilidade de efeitos colaterais. Sendo assim, torna-se importante avaliar o efeito da presença do íon estrôncio nas microesferas de alginato/beta-fosfato tricálcico/estrôncio, como forma de dispor um novo material de enxerto que possa ser usado como regenerador ósseo no tratamento de pacientes que apresentam algum tipo de lesão ou perda óssea.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo geral produzir microesferas de alginato/beta-fosfato tricálcico/estrôncio e avaliar a liberação *in vitro* do estrôncio.

De um modo específico, deseja-se realizar:

1) Produção de microesferas de alginato/β-TCP contendo estrôncio.

2) Incorporação do íon estrôncio ao compósito alginato/β-TCP por duas vias: (a) Produção de microesferas de alginato/β-TCP em meio de solução de cloreto de estrôncio e (b) Produção de microesferas de alginato/β-TCP em meio à suspensão do fármaco ranelato de estrôncio.

3) Caracterização morfológica e físico-química das microesferas produzidas.

4) Identificação e análise quantitativa do íon estrôncio nas microesferas produzidas.

5) Avaliação da liberação *in vitro* de estrôncio a partir das microesferas produzidas em dois diferentes meios: pH 7,4 e pH 4,0.

6) Investigação da citotoxicidade nas microesferas produzidas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO E OBTENÇÃO DO β-TCP

O pó precursor empregado nesse estudo foi uma hidroxiapatita cálcio-deficiente comercial (CDHA) (Tricalcium phosphate, TCP, Merck, Darmstadt, Alemanha). O pó foi triturado e passado em peneira de 125 µm. O pó fino foi tratado termicamente à 900 ^{o}C durante 4 h, numa taxa de aquecimento 3 ^{o}C/min dando origem ao β-TCP.

4.2 PRODUÇÃO DE MICROESFERAS DE ALGINATO/β-TCP INCORPORADAS COM ÍON ESTRÔNCIO

A incorporação do íon estrôncio foi realizada em uma única etapa, juntamente com a produção das microesferas de alginato/β-TCP. Para a incorporação desse íon foram empregadas duas metodologias: incorporação do íon estrôncio empregando solução de cloreto de estrôncio hexa-hidratado ($SrCl_2.6H_2O$, Merck, Darmstadt, Alemanha) e incorporação do íon estrôncio empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (SrRan, Protelos, Gidy, França).

A Figura 12 mostra o fluxograma das etapas empregadas para a produção das microesferas de alginato/β-TCP incorporadas com íon estrôncio.

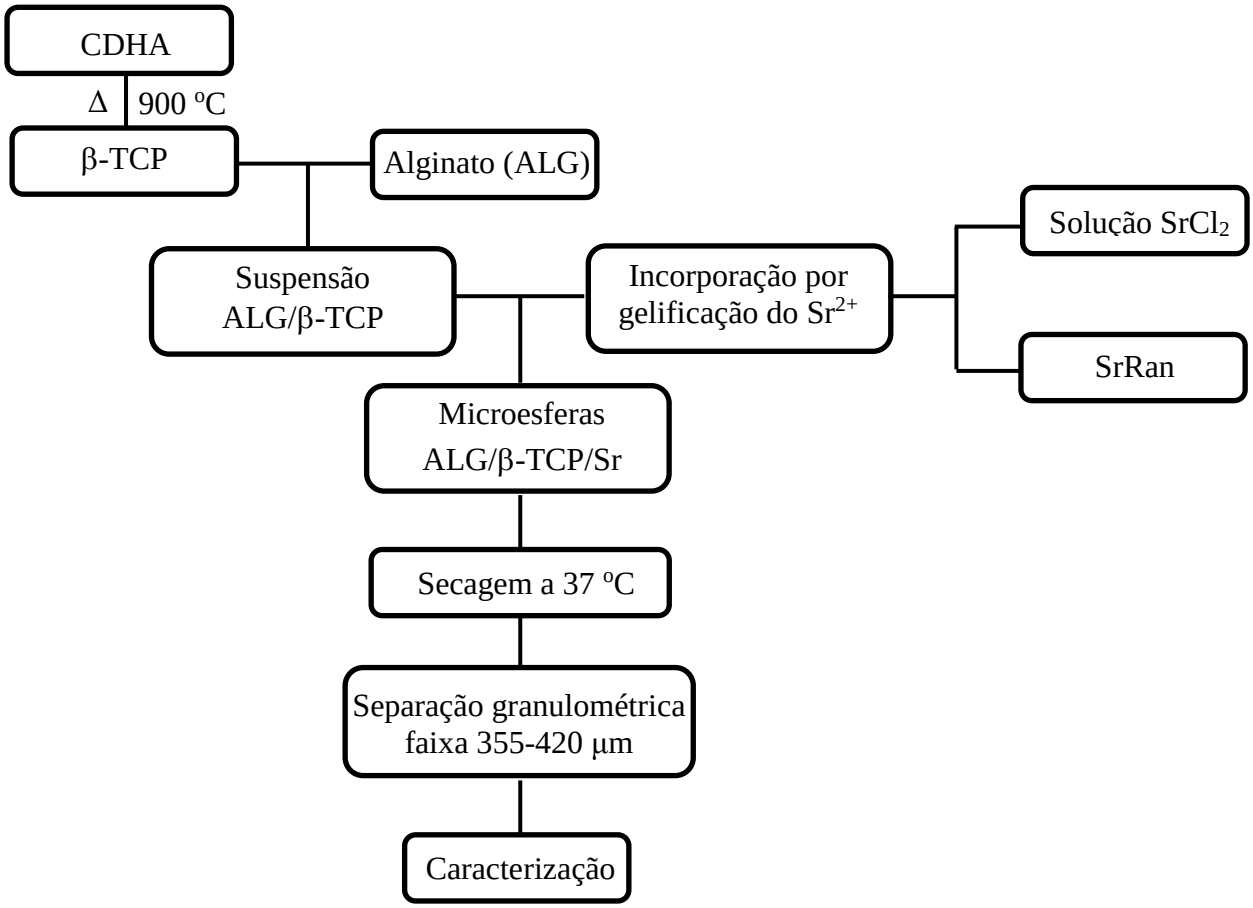


Figura 12: Fluxograma esquemático para a produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr.

4.2.1 Incorporação do Íon Estrôncio empregando Solução de Cloreto de Estrôncio

Pesou-se, separadamente, 1,5 g do pó de β-TCP e 0,1 g de alginato (Alginic acid sodium salt from brown algae, Fluka, Steinheim, Noruega) mantendo-se a relação alginato/β-TCP de 1:15. Adicionou-se 5 mL de água deionizada lentamente ao alginato, de forma a evitar grumos. Outros 5 mL de água foram acrescentados ao pó de β-TCP e este foi então adicionado à solução de alginato. A mistura obtida foi peneirada (abaixo de 75 µm) e extrudada diretamente em uma solução de cloreto de estrôncio ($SrCl_2.6H_2O$, 0,15 $mol.L^{-1}$) utilizando agulha hipodérmica de calibre de 0,45 mm sob agitação magnética lenta. As microcápsulas foram mantidas overnight na solução de $SrCl_2.6H_2O$ para obter um melhor rendimento e garantir a troca total do Na^+ pelo Sr^{2+}. Posteriormente, as microesferas foram

lavadas com bastante água (3x100 mL) e secas a 37 ºC. Após a secagem, as microcápsulas foram separadas por peneiramento em diferentes faixas granulométricas que variam de 355 a 1000 µm e o intervalo de interesse escolhido para os testes posteriores foi de 355 a 425 µm segundo a norma ISO 10993-9 (1994).

A fim de verificar se a concentração de estrôncio incorporada nas microesferas seria influenciada pela concentração do agente gelificante, novas microesferas de ALG/β-TCP/Sr foram preparadas empregando uma solução de $SrCl_2.6H_2O$ (1,5 $mol.L^{-1}$), ou seja, 10 vezes mais concentrada que a anterior.

O rendimento para a produção das microesferas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% R = \frac{m_f - m_0}{m_0} x\ 100 \qquad \text{(Equação 4.1)}$$

Onde, m_f é a massa das microsesferas produzidas, m_0 é a massa inicial do pó de β-TCP e R é o rendimento da produção dado em porcentagem.

4.2.2 Incorporação do Íon Estrôncio empregando o Fármaco Ranelato de Estrôncio

O ranelato de estrôncio empregado nos experimentos foi da Protelos® onde cada sachê de 4g contém 2g de ranelato de estrôncio. O sachê possui como excipientes: aspartame, maltodextrina, manitol em q.s.p.

O mesmo procedimento para a produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando $SrCl_2$ foi adotado, como descrito no item 4.2.1. No entanto, a suspensão ALG/β-TCP foi extrudada numa solução contendo cloreto de cálcio ($CaCl_2$ 0,15 $mol.L^{-1}$, Merck, Darmstadt, Alemanha) e SrRan (3,85% p/v) na proporção de 1:1. As microcápsulas foram mantidas em agitação na mistura de $CaCl_2$ e SrRan por 24 h. As esferas produzidas foram lavadas com água (3x100 mL) e filtradas para a remoção do ranelato de estrôncio não incorporado às microesferas. Posteriormente, as microesferas foram secas a 37 ºC e peneiradas na faixa de tamanho entre 355 e 425 µm.

Novas microesferas de ALG/β-TCP/Sr também foram preparadas empregando uma maior concentração de SrRan (38,5% p/v, 10 vezes maior que a anterior). No entanto, manteve-se a concentração da solução de $CaCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}), utilizando a mistura $CaCl_2$:SrRan na mesma proporção de 1:1. Esse teste foi realizado para verificar se a concentração de estrôncio incorporada nas microesferas seria influenciada pela concentração do fármaco.

4.3 ENSAIO DE ADSORÇÃO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO

Microesferas de ALG/β-TCP foram produzidas de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.1, porém utilizando como agente gelificante uma solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$, 0,15 mol.L^{-1}).

As microesferas de ALG/β-TCP (250 mg) na faixa de 350-420 μm foram imersas em 5 mL de uma suspensão de SrRan em duas diferentes concentrações: 3,85% e 38,5% p/v. Os tubos foram mantidos na horizontal, em uma incubadora com agitação orbital (Shaker – MSM 130/B, M.S. Mistura) a 37 ºC sob agitação de 120 rpm por 24 horas. Em seguida, o meio foi filtrado e reservado, para posterior análise. As microesferas resultantes, ALG/β-TCP/SrRan, foram lavadas com água ultra pura e secas a 37 ºC.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE ALG/β-TCP/Sr

4.4.1 Análise Química

As concentrações dos íons cálcio e estrôncio presentes nas microesferas produzidas foram determinadas por Espectrofotometria de absorção atômica por chama (EAA, Shimadzu AA-6800) no Laboratório de Análises Químicas do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM).

A quantificação do íon estrôncio presente nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas foi feita por dois processos: método direto e método indireto. O método direto

consiste em realizar a abertura das microesferas produzidas e fazer a leitura da concentração de cálcio e estrôncio por EAA. No método indireto, durante o processo de produção das microesferas, todas as soluções utilizadas e remanescentes, incluindo as águas de lavagem das microesferas foram analisadas por EAA. Assim, a concentração de cálcio e estrôncio são obtidas pela diferença da concentração da solução inicial e das duas soluções (pós-produção e água de lavagem).

A abertura das microesferas (50 mg) foi realizada empregando-se uma mistura de $HCl:HNO_3$ na proporção de 3:1 (4 mL) a 60 ^oC. Após a abertura, a solução foi filtrada e avolumada a 50 mL.

Para a leitura dos íons Ca (λ=442,7 μm) e Sr (λ=460,7 μm) foi empregada chama de óxido nitroso/acetileno e cloreto de potássio (KCl 0,5 % v/v, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usado como supressor de ionização. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.4.2 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A espectroscopia no UV-Vis foi empregada para determinar a quantidade de ranelato de estrôncio incorporada nas microesferas de ALG/β-TCP/SrRan. Para isso, foi utilizado um espectrômetro UV-VIS 2550 da Shimadzu acoplado ao acessório ISR-2200 Integrating Sphere Attachment, que permite fazer análises em amostras sólidas. As medições foram realizadas no Laboratório de Materiais Biocerâmicos do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). As esferas foram maceradas, homogeneizadas com sulfato de bário ($BaSO_4$) e inseridas no porta-amostra. O $BaSO_4$ funciona como um branco para esse tipo de análise já que não possui absorção na região ultravioleta-visível (200-800 nm).

A espectroscopia no UV-Vis é amplamente aplicada na determinação quantitativa de compostos orgânicos ou inorgânicos em amostras que possuam grupamentos capazes de absorver radiação nessa região (grupos absorventes). O princípio básico consiste em quando uma amostra é submetida a uma radiação incidente (I_o), parte dessa radiação é absorvida e a outra parte é transmitida (I). A absorção da luz depende do caminho ótico percorrido, da concentração do analito e das espécies absorventes contidas na amostra. Essa relação existente

entre as intensidades de radiação incidente e transmitida pode ser expressa pela absorvância, de acordo com a Lei de Beer:

$$A = \log\frac{Io}{I} = -\log T = \varepsilon.\mathrm{C}.\mathrm{l} \qquad \text{(Equação 4.2)}$$

Onde, I_o é a intensidade da luz incidente; I é a intensidade da luz transmitida; ε é a absortividade molar; C é a concentração do analito; l é o caminho ótico, ou seja, a espessura da amostra.

De acordo com a Lei de Beer, verifica-se uma relação linear entre a absorvância e a concentração da amostra. Dessa forma é possível determinar a concentração de uma espécie numa certa amostra, através da leitura de sua absorvância.

Geralmente, numa análise espectrofotométrica, a identificação da absorvância de um composto é feita no comprimento de onda máximo (λ_{max}). Isso significa que a amostra naquele determinado comprimento de onda teve um máximo de absorvância (A_{max}). Considerando que cada composto tem um comprimento de onda máximo específico, esse dado é usado para identificação e quantificação da espécie presente.

No caso do ranelato de estrôncio, o λ_{max} é em 323 nm (MYTHILI *et al.*, 2011; SWAMI *et al.*, 2012). Dados na literatura para quantificação desse fármaco são restritos, pois sua solubilidade é bem limitada. O SrRan é parcialmente solúvel em água, metanol, acetonitrila e outros, o que dificulta sua caracterização pelos métodos convencionais, por HPLC (High-performance liquid chromatography). Segundo SWAMI *et al.* (2012), para a determinação de SrRan por Espectrofotometria no UV-Vis, emprega-se como solvente um tampão de dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) e metanol (CH_3OH) na proporção de 3:1, em pH 3 mantido com adição de ácido fosfórico (H_3PO_4). Essa solução é capaz de solubilizar o SrRan e mantê-lo em solução para ser quantificado.

Como as microesferas obtidas nesse estudo são compostas de β-TCP, optou-se por não solubilizá-las no tampão indicado e, por isso, a quantificação do SrRan foi feita através de um espectrômetro de UV-Vis empregando o acessório para sólidos. Inicialmente, foi realizada uma varredura isoladamente com os componentes sólidos contidos nas microcápsulas a fim de verificar se o comprimento de onda de absorção para o alginato e o β-TCP não interfeririam na curva para o SrRan.

Visto que os comprimentos de onda não eram coincidentes, uma nova varredura foi realizada empregando diferentes concentrações do ranelato de estrôncio (Figura 13). O perfil da curva comprimento de onda versus absorvância obtido para o SrRan é similar ao encontrado na literatura. A diferença básica é que na literatura o SrRan empregado foi fornecido pela Enaltech Lab Ltd, enquanto que o do presente estudo é da Protelos®. Outra diferença é que SWAMI *et al.* (2012) usaram o solvente como referência e neste caso, a referência usada foi o $BaSO_4$.

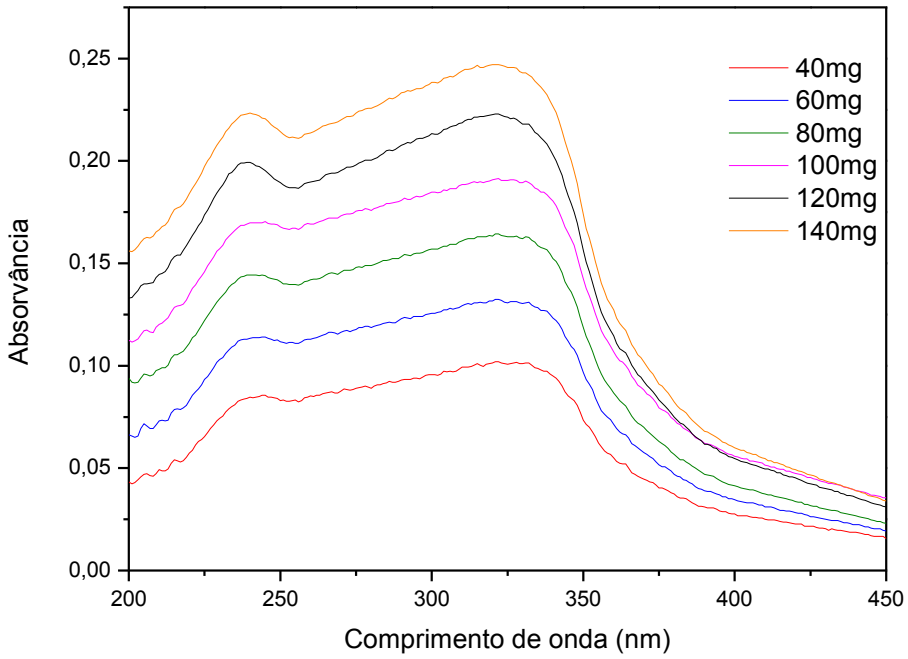


Figura 13: Espectro de absorção no UV-Vis do ranelato de estrôncio em diferentes concentrações.

De acordo com a Figura 13 observa-se que à medida que a concentração de SrRan aumenta, a absorvância também aumenta, seguindo o padrão linear da Lei de Beer. Sendo assim, para quantificar o ranelato de estrôncio foi empregado o princípio dessa lei, onde a absorvância é diretamente proporcional à concentração. Assumindo esta relação, uma curva analítica foi construída utilizando massas conhecidas de ranelato de estrôncio e assinalando a absorvância correspondente (Figura 14).

Para mensurar o teor de ranelato de estrôncio presente nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas basta relacionar o valor obtido de absorvância máxima com a equação da reta proveniente da curva analítica do SrRan.

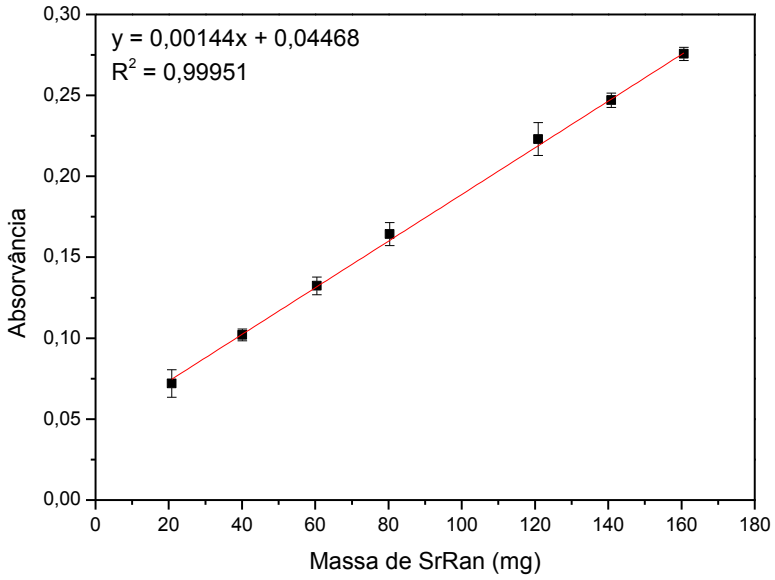


Figura 14: Curva analítica do Ranelato de Estrôncio.

4.4.3 Difração de raios X (DRX)

Os materiais produzidos foram caracterizados por difração de raios X para identificação das fases presentes e cristalinidade do material. As medidas de DRX para as amostras obtidas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais – LMCM do PEMM num difratômetro de pó (XRD-6000 da Shimadzu) com radiação de CuKα (λ = 1,5418Å). Os difratogramas foram obtidos no intervalo angular de 3 a 80º em 2θ, passo de 0,02 graus por segundo.

Os difratogramas dos materiais produzidos foram analisados utilizando o software Match! da Crystal Impact (versão 1.10) para identificação de fases. O software compara o padrão de difração experimental com seu banco de dados e identifica a fase cristalina presente na amostra.

4.4.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A fim de verificar os grupamentos químicos existentes nos materiais produzidos, as medidas de FTIR foram realizadas no LMCM/PEMM num espectrômetro Spectrum 100 da PerkinElmer, utilizando o módulo de Reflectância Total Atenuada (Attenuated total reflectance, ATR) na faixa de 4000 a 550 cm^{-1}, com 32 varreduras e 4 cm^{-1} de resolução.

4.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS)

A morfologia das microesferas produzidas foi analisada por MEV (JEOL JSM 6460LV) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica e Microanálise do PEMM. As amostras foram fixadas em um suporte de alumínio com fita de carbono dupla face e recobertas com uma fina camada de ouro (metalizador Emitech, K550) para evitar carregamento elétrico. As micrografias foram obtidas utilizando-se uma aceleração de voltagem de 15 ou 20 kV.

Algumas imagens das microesferas produzidas foram realizadas no Laboratório de Microscopia do IME utilizando o equipamento FEI Quanta 250 FEG e metalizador Emitech K550X, nas mesmas condições anteriores.

O EDS (Thermo/System Six modelo 200) foi empregado para identificar qualitativamente os íons estrôncio presentes e observar a homogeneidade da distribuição desses íons nas microesferas produzidas.

4.4.6 Análise termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica mede a estabilidade térmica de um material através da variação de massa em função do tempo sob atmosfera controlada. As análises de TG foram realizadas no Laboratório de Termoanálise e Reologia (LabTer da Escola de Química/UFRJ) usando o equipamento Pyris 1 TGA da PerkinElmer. O experimento foi conduzido com 5 mg de amostra em cadinho de Pt e atmosfera de gás N_2 (fluxo de 30 $mL.min^{-1}$) a partir da temperatura ambiente à 800 ^{o}C, numa taxa de aquecimento de 10 $^{o}C.min^{-1}$.

4.5 TESTES *IN VITRO* DE DISSOLUÇÃO E LIBERAÇÃO DE ESTRÔNCIO

Os testes *in vitro* foram realizados de acordo com a norma ISO 10993-9 (1994). Microesferas de ALG/β-TCP/Sr (250 mg) na faixa granulométrica de 355-420 μm foram colocadas em tubo Falcon de polipropileno onde 5 mL de uma solução tampão foram adicionados. A solução tampão é composta por cloreto de sódio (NaCl, 10 $mmol.L^{-1}$), hidrogeno carbonato de sódio ($NaHCO_3$, 45 $mmol.L^{-1}$) e carbonato de potássio (K_2CO_3, 2 $mmol.L^{-1}$). Ácido lático foi usado para ajustar o pH da solução tampão em 7,4 para simular o fluido corpóreo e 4,0 para simular um processo inflamatório. Os tubos foram mantidos na horizontal em uma incubadora com agitação orbital a 37 ºC sob agitação de 120 rpm (Shaker – MSM 130/B, M.S. Mistura). As microcápsulas permaneceram em contato com a solução tampão em diferentes intervalos de tempo: 12, 24, 48, 72 horas, 7 e 14 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o tempo previsto para a avaliação da dissolução, a solução tampão foi filtrada e reservada, para posterior análise de Ca e Sr por EAA. As microesferas resultantes foram lavadas com água ultra pura, secas a 37 ºC e analisadas por DRX, FTIR, MEV e EAA onde foi necessário realizar a abertura das amostras como descrito no item 4.4.1.

4.6 TESTE DE INCHAMENTO

O teste de inchamento foi realizado a fim de verificar a capacidade que as microesferas apresentam em absorver água. Essa capacidade de absorção de água está relacionada com a eficiência de liberação de um fármaco. Uma vez que o material absorva muita água, implica em um maior inchamento e, consequentemente, mais facilmente o fármaco será liberado.

O ensaio consistiu em pesar 250 mg de microesferas de ALG/β-TCP/Sr na granulometria de 355-420 μm e adicionar 5 mL do meio. Dois tipos de meio foram empregados para avaliar o intumescimento das microesferas: uma solução de PBS (phosphate buffer saline) e água milli-Q.

O teste foi realizado em uma incubadora com agitação orbital (Shaker MSM 130/B, M.S. Mistura) a 37 ºC sob agitação de 120 rpm. A mudança de massa foi monitorada em

intervalos de tempo (2, 4, 6, 12, 24 e 48 horas), em que o meio era removido e as microesferas pesadas em balança analítica (Shimadzu AY220). Posteriormente, o meio era devolvido ao tubo e este colocado de volta à incubadora. A pesagem foi mantida até que a massa das microesferas permanecesse constante ou se fosse observada sua dissolução. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

O grau de inchamento das microesferas foi calculado segundo a equação:

$$\% I = \frac{m_f - m_0}{m_0} x\ 100 \qquad \text{(Equação 4.3)}$$

Onde, m_f é a massa das microsesferas úmidas, m_0 é a massa inicial das microesferas secas e I é o grau de inchamento dado em porcentagem.

4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade das microesferas de ALG/β-TCP/Sr foi realizada principalmente devido à presença do íon estrôncio no biomaterial. Os testes de citotoxicidade consistem em colocar as microesferas em contato com uma cultura de células e observar as alterações celulares que podem ocorrer.

Para avaliar a citotoxicidade das microesferas de ALG/β-TCP/Sr, três ensaios foram realizados: XTT (hidróxido de 2,3-bis[2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil]-5-(carbonil fenilamina)-2H-tetrazólio), NR (neutral red, 2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina) e CVDE (Crystal violet dye elution).

O teste de XTT mede a atividade mitocondrial das células viáveis através da redução do sal de tetrazólio, de coloração amarela solúvel pela enzima succinato desidrogenase presente na mitocôndria. O produto gerado, o sal de formazan, é de coloração azul e insolúvel. Assim, a capacidade que as células apresentam na redução do XTT fornece informações sobre a atividade e integridade mitocondrial, sendo então relacionadas com a viabilidade celular.

O método NR mede a permeabilidade e a integridade da membrana lisossomial através da capacidade de retenção do corante pelos lisossomas das células viáveis. O NR é um corante solúvel em água e penetra facilmente na membrana celular, concentrando-se nos lisossomas das células vivas. A perda da permeabilidade da membrana celular por substâncias

que podem lesá-las implica em menor captura e, consequentemente, menor retenção do corante, podendo então serem distinguidas as células vivas e mortas.

A técnica por CVDE mede a densidade e proliferação celular por coloração do DNA. O cristal violeta é um corante que se acumula no núcleo das células vivas, corando a cromatina e ligando-se às proteínas nucleares. Dessa forma é possível estimar o número de células viáveis.

A combinação dos três testes permite uma maior confiabilidade dos resultados no que se refere a considerar o biomaterial, no caso as microesferas de ALG/β-TCP/Sr, como citotóxicas ou não.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Células e Biocerâmicas do CBPF de acordo com as normas ISO 10993-12 (1996) e ISO 10993-5 (1999). Os dois tipos de microesferas de ALG/β-TCP/Sr, aquelas produzidas empregando solução de $SrCl_2$ e as produzidas empregando o fármaco SrRan, foram utilizadas para avaliação da citotoxicidade. Antes dos testes, as amostras foram esterilizadas através de radiação gama (25 kGy).

Os extratos das microesferas foram obtidos após imersão dos mesmos em meio de cultura alpha modified minimum essential medium (α-MEM) sem soro fetal bovino (SFB), na concentração de 100 mg/mL (material/meio de cultura α-MEM), durante 24h, a 37 ºC em atmosfera de 5 % de CO_2.

A citotoxicidade para cada microesfera foi determinada utilizando-se células do tipo MC3T3 (0,8x104 células/poço). Após 24h, o meio de cultura contendo o extrato foi removido e as células foram lavadas com PBS. Cada ensaio foi repetido duas vezes e em sextuplicata.

Como controle positivo foram utilizadas células em sodium dodecyl sulfate (SDS 1 %) e como controle negativo, células em α-MEM. Para análise estatística foi utilizado o método (ANOVA) e pos-test de Dunnett, representativo de dois experimentos independentes em sextuplicata. As amostras foram normalizadas em porcentagem e comparadas ao controle negativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse item foi dividido em quatro partes que correspondem aos seguintes resultados: Parte I – caracterização dos materiais de partida; Parte II – caracterização das microesferas obtidas empregando solução de cloreto de estrôncio com duas diferentes concentrações; Parte III – resultados obtidos pela caracterização das microesferas obtidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio em duas concentrações distintas e Parte IV – caracterização das microesferas a partir do ensaio de adsorção do ranelato de estrôncio.

PARTE I – MATERIAIS DE PARTIDA

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS DE PARTIDA

Os materiais de partida como TCP comercial, beta-fosfato tricálcico (β-TCP), alginato (ALG) e ranelato de estrôncio (SrRan) foram caracterizados por DRX e FTIR.

5.1.1 Caracterização do pó de beta-fosfato tricálcico

O pó de TCP comercial empregado trata-se de uma hidroxiapatita cálcio-deficiente (CDHA) que submetida a um tratamento térmico em elevada temperatura (900 ^{o}C) dá origem ao beta-fosfato tricálcico (β-TCP). O difratograma comparativo dos materiais, antes e após a calcinação, pode ser observado na Figura 15.

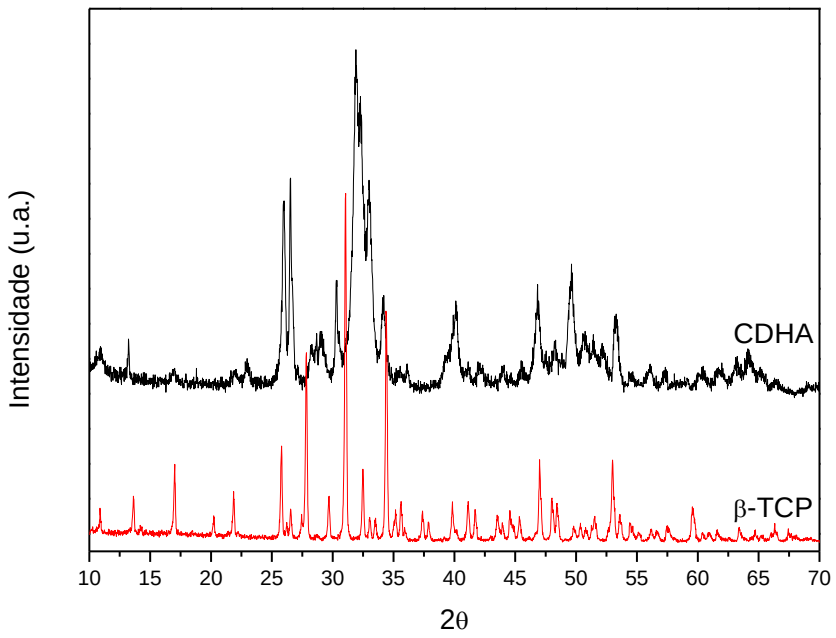
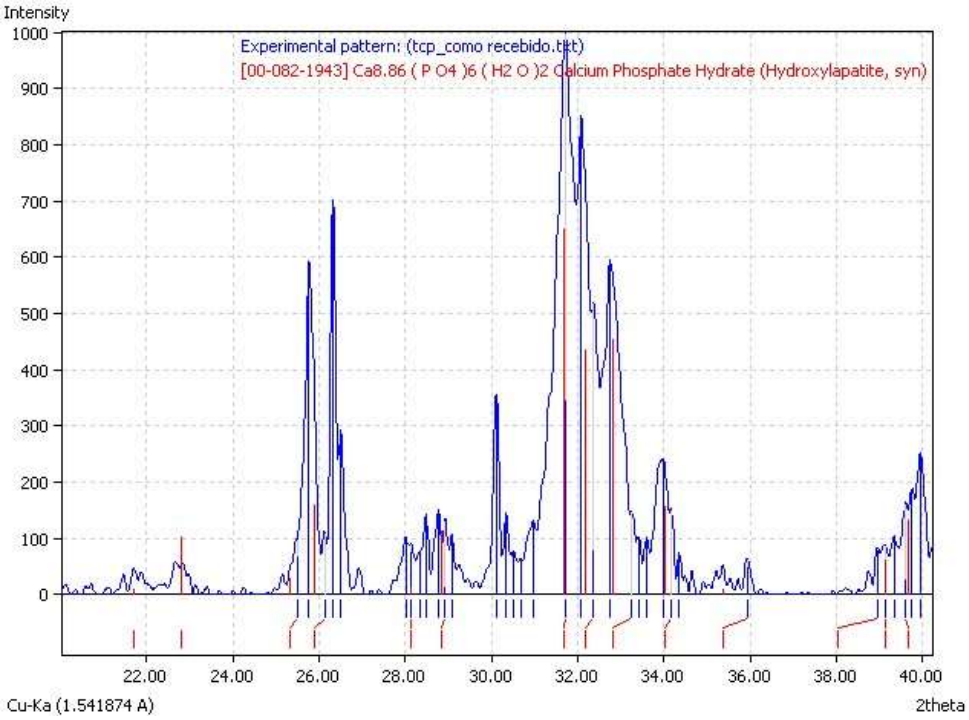


Figura 15: Difratograma de raios X das amostras CDHA e β-TCP.

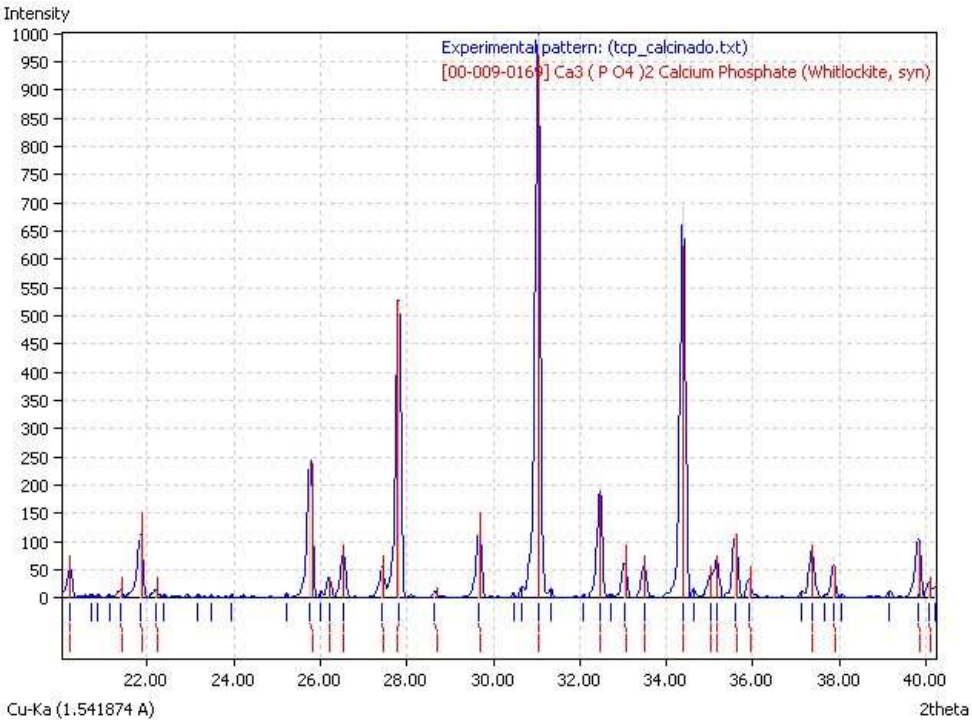
Pode-se observar que após a calcinação, os picos de difração foram deslocados e ficaram mais estreitos, caracterizando um material mais cristalino. Os picos de difração observados no pó como recebido correspondem a CDHA e, os picos do pó pós-tratamento correspondem ao β-TCP, de acordo com o banco de dados JCPDS: 82-1943 e 9-0169, respectivamente.

Os difratogramas dos materiais foram analisados utilizando o software Match! da Crystal Impact (versão 1.10) onde foi possível a identificação da fase cristalina presente (Figura 16). Observa-se que o diagrama obtido para a amostra CDHA (Figura 16a) corresponde realmente a uma hidroxiapatita cálcio-deficiente com grau de ajuste de 77%.

No diagrama do β-TCP (Figura 16b), observa-se que as reflexões de Bragg podem ser consideradas coincidentes entre o difratograma experimental e o teórico, obtendo-se então um grau de ajuste de 95% e que nenhuma outra fase cristalina está presente. Isto indica que o tratamento térmico (calcinação) a 900 ºC foi eficaz na transformação da CDHA a β-TCP.



(a)



(b)

Figura 16: Diagramas obtidos pelo programa Match!: (a) CDHA e (b) β-TCP (curva azul – difratograma experimental; curva vermelha – difratograma teórico).

Os espectros de infravermelho dos pós de CDHA e β-TCP podem ser observados na Figura 17.

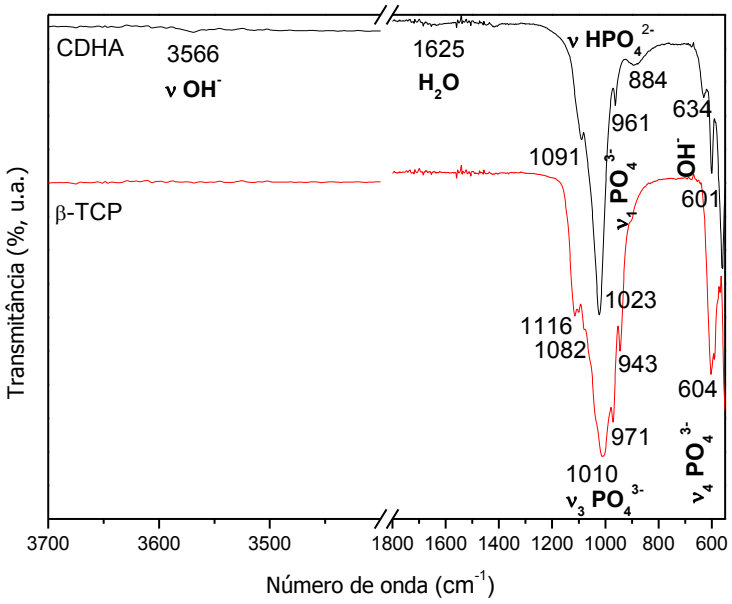


Figura 17: Espectros de FTIR das amostras CDHA e β-TCP.

O espectro da amostra CDHA exibe uma banda em 3566 cm^{-1} característica do estiramento da ligação O-H estrutural da apatita, o qual a vibração da ligação O-H também pode ser observada pela banda em 634 cm^{-1}. Essas bandas estão ausentes no β-TCP, uma vez que se trata de um fosfato de cálcio e que não apresenta o grupo OH^- em sua estrutura. A banda em 884 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação P-O(H) e indica a presença do grupo HPO_4^{2-}, característico de uma apatita cálcio deficiente (SZ-CHIAN *et al*, 2004).

As bandas que aparecem na região de 1000-1120 e 940-980 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, aos estiramentos não simétricos (ν_3) e simétricos (ν_1) da ligação P-O, enquanto que as bandas em 640-590 cm^{-1} se referem à deformação angular ν_4 da ligação O-P-O do grupo PO_4^{3-}. Segundo JONG-SHING, BOW; SZ-CHIAN, LIOU e SAN-YUAN, CHEN (2004), a presença de bandas em 1116, 1082, 1010, 971 e 943 cm^{-1} é atribuída ao grupo fosfato característico do β-TCP.

5.1.2 Caracterização do alginato

O polímero utilizado como veículo para a formação das microesferas foi o alginato de sódio. Como se trata de um composto polimérico, o perfil de difração (Figura 18) é predominantemente amorfo, onde são observados somente os picos principais de difração do alginato de sódio em 13 e 22º juntamente com o halo amorfo.

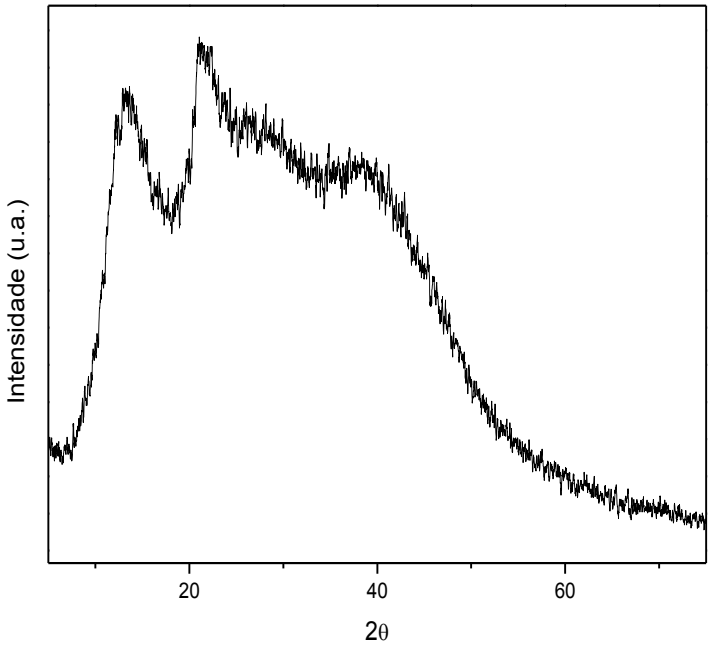


Figura 18: Difratograma de raios X do alginato de sódio.

O espectro de FTIR (Figura 19) exibe bandas características de um alginato sódico. A banda em 3240 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação O-H, enquanto que a banda em 892 cm^{-1} se refere à deformação angular fora do plano da ligação O-H presente nos grupamentos ácidos do alginato. A banda que aparece em 2922 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C-H que compõe a cadeia polimérica. A banda em 1593 cm^{-1} se refere ao estiramento assimétrico C=O da carbonila e as bandas em 1405 e 1300 cm^{-1} são características da vibração do grupo COO^- do alginato. As bandas vibracionais presentes em 1081, 1022 e 946 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento da ligação C-O-C (TAMPIERI *et al.*, 2005; RIBEIRO, BARRIAS e BARBOSA, 2004).

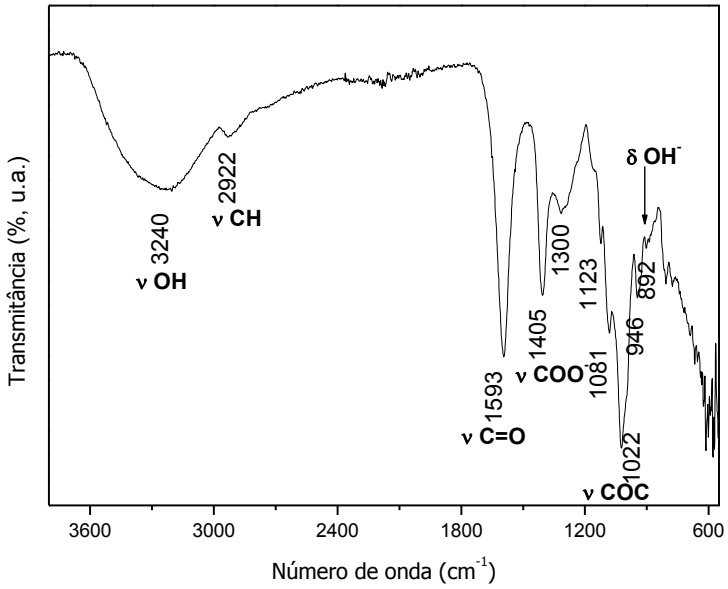


Figura 19: Espectro de FTIR do alginato de sódio.

5.1.3 Caracterização do ranelato de estrôncio

O fármaco ranelato de estrôncio (SrRan) foi escolhido como uma das fontes de estrôncio para a produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr. Os resultados de DRX e FTIR estão exibidos nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

O ranelato de estrôncio apresenta polimorfos que se diferenciam pela porcentagem de água intrínseca do composto. Basicamente, o SrRan se apresenta na forma cristalina ou amorfa. Geralmente, o SrRan anidro encontra-se na forma amorfa. As formas cristalinas do SrRan são a tetra, hepta e octahidrato.

Segundo ALBRECHT *et al*. (2010), as forma cristalinas I (tetrahidrato), II (octahidrato) e III (heptahidrato) do ranelato de estrôncio podem ser distinguidas pelos picos principais de difração ($2\theta \pm 0{,}2^{o}$) (Tabela 5). A fundamental distinção entre as espécies está no início do perfil do difratograma, na faixa de 2θ de 8 a 11°. Independente da diferença, o ranelato de estrôncio empregado neste trabalho apresenta-se na forma cristalina, com provável tendência para a forma II (octahidrato), como pode ser observado na Figura 20, confirmado pelos dados obtidos por ALBRECHT *et al*. (2010).

Tabela 5: Valores distintos de 2θ para as três formas cristalinas do ranelato de estrôncio.

	Forma cristalina I (Tetrahidratado)	Forma cristalina II (Octahidratado)	Forma cristalina III (Heptahidratado)
2θ	8,7	8,7	9,2
	12,6	9,2	10,5
	17,6	10,4	13,9
	20,3	13,7	14,2
	23,1	17,5	19,7
	26,3	19,7	26,8
	27,5	25,5	27,2
	29,5	27,1	

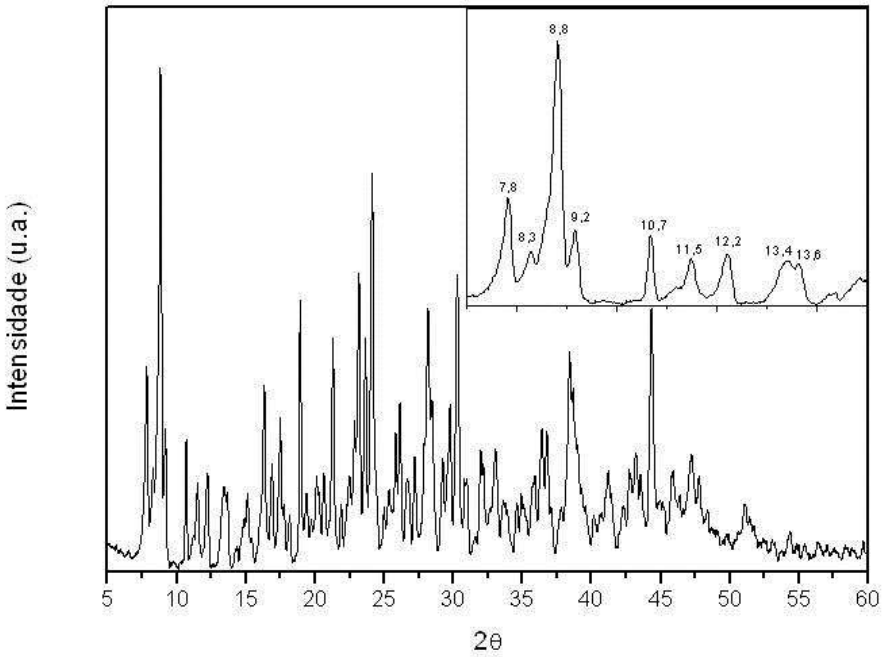


Figura 20: Difratograma de raios X do ranelato de estrôncio. Detalhe na faixa de 2θ (7 a 15º).

Em relação ao espectro de FTIR (Figura 21), a diferença observada entre os polimorfos está na banda em aproximadamente, 2200 cm^{-1}. A forma I exibe uma banda dupla nessa região, enquanto que a forma II mostra somente uma banda em aproximadamente, 2203 cm^{-1}. Outras diferenças podem ser observadas na faixa de 1650 a 1500 cm^{-1}. Bandas em 1550 e 1515 cm^{-1} são características do octahidrato (forma II), enquanto que bandas em 1565 e 1515 cm^{-1} são referentes ao tetrahidrato (forma I). A presença da banda em 3246 cm^{-1} indica a presença de OH^- e é uma banda característica da forma cristalina do octahidrato (ALBRECHT *et al*., 2010).

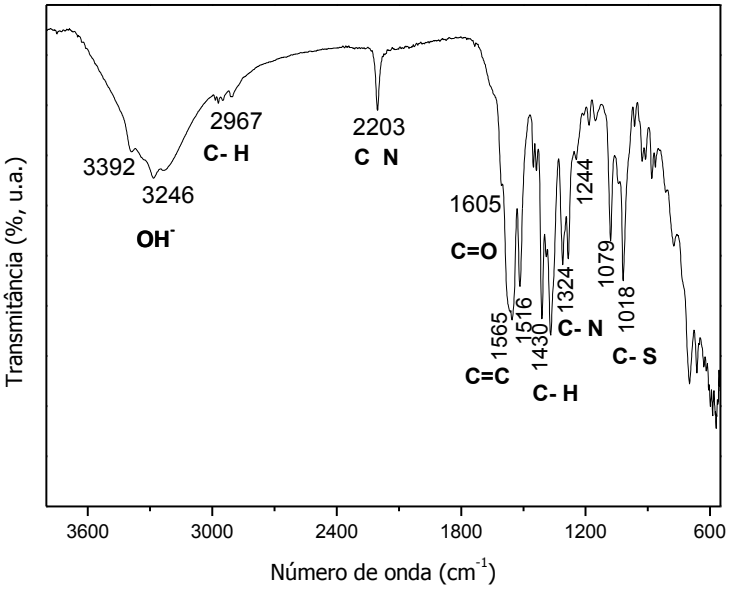


Figura 21: Espectro de FTIR do ranelato de estrôncio.

PARTE 2 – MICROESFERAS DE ALG/β-TCP/Sr EMPREGANDO SOLUÇÃO DE CLORETO DE ESTRÔNCIO

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS MICROESFERAS DE ALG/β-TCP/Sr

5.2.1 Microesferas produzidas pela incorporação do íon estrôncio empregando solução menos concentrada de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1})

Inicialmente foi realizado um estudo de reprodutibilidade do método de produção das microesferas utilizando como agente gelificante o cloreto de estrôncio, uma vez que o método convencional emprega o cloreto de cálcio. O procedimento foi realizado em triplicata e as microesferas de ALG/β-TCP/Sr foram produzidas com 98 % de rendimento.

Como o método empregado para a produção das microesferas foi o de extrusão, ele possibilita a produção de esferas de diferentes diâmetros, sendo influenciada pela concentração e viscosidade da solução de alginato, velocidade de extrusão, diâmetro da agulha por onde passa a solução de alginato e distância da ponta da agulha à solução reticulante. Mesmo fixando todos esses parâmetros, concentração do alginato = 1%, diâmetro da agulha (Ø = 0,45 mm), distância = 2 cm e velocidade = 160 μL/s, produziu-se esferas de diferentes tamanhos, conforme mostra a distribuição granulométrica apresentada na Figura 22. Nota-se que a faixa granulométrica obtida em maior fração é a de 500-600 μm e que somente 16% das microesferas produzidas encontram-se na faixa de trabalho desejada (355-420 μm).

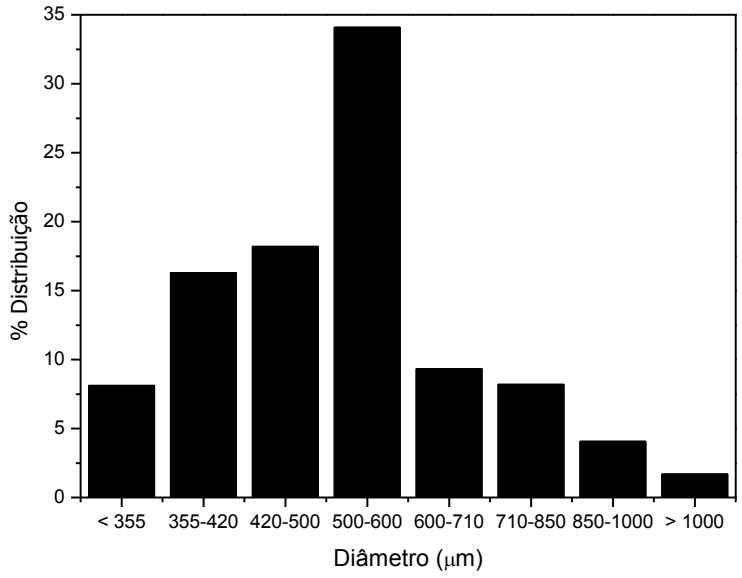
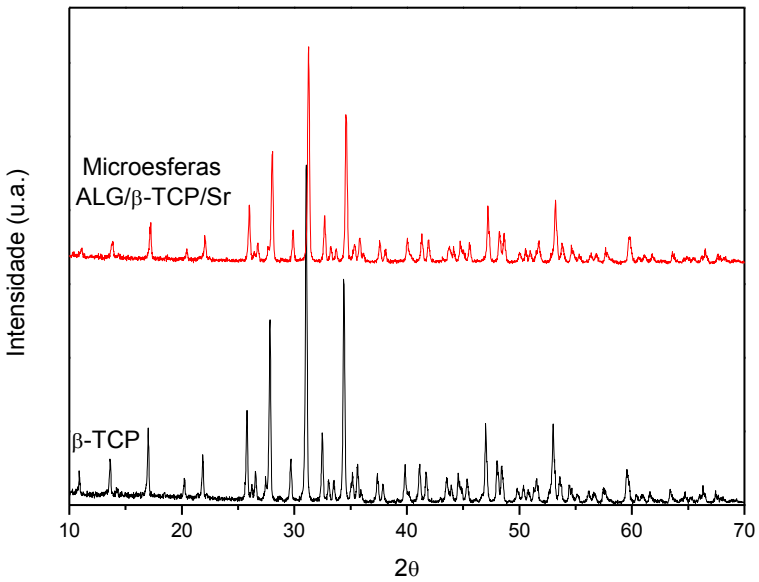


Figura 22: Distribuição de tamanho das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}) como agente reticulante.

O difratograma das microesferas produzidas está apresentado na Figura 23a. É possível observar que as reflexões de Bragg para as microcápsulas estão ligeiramente deslocadas para valores de 2θ maiores em relação às reflexões do fosfato tricálcico (Figura 23b). Segundo RAJKUMAR, MEENAKSHISUNDARAM e RAJENDRAN (2011), esse fato pode estar relacionado à contração da matriz polimérica decorrente da ligação química entre o alginato e o β-TCP.



(a)

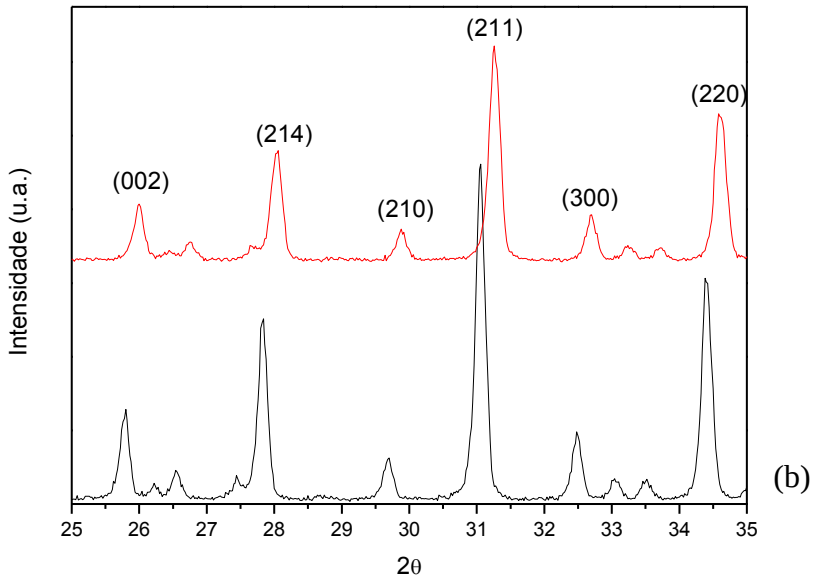


Figura 23: (a) DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}) e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º).

ROKIDI e KOUTSOUKOS (2012) relataram um deslocamento para menores valores de 2θ e um alargamento dos picos de difração, principalmente, o de *hkl* (002) para amostras com diferentes teores de Sr. O íon estrôncio possui raio iônico (1,12 Å) maior que o íon cálcio (0,99 Å). Quando o íon Sr ocupa parte das posições do íon Ca, ocorre um aumento da distância interplanar (*d*) dos cristais e um aumento dos parâmetros de rede (*a* e *c*), justificando o deslocamento nas reflexões de Bragg. Como não foi observado esse deslocamento para as microesferas produzidas, provavelmente, a quantidade de estrôncio incorporada às microesferas é desprezível, não sendo detectada por DRX.

Nota-se ainda no difratograma, um perfil de difração bem cristalino e que o pico de maior intensidade (211) do β-TCP puro encontra-se menos intenso para as microesferas produzidas. Não foi possível notar um alargamento significativo dos picos de difração para as microesferas produzidas, indicando uma diminuição da cristalinidade, embora BIGI *et al.* (2007) tenha relatado que o alargamento dos picos é mais evidente para amostras que contenham baixo teor de Sr.

O difratograma das microesferas de ALG/β-TCP/Sr foi analisado utilizando o software Match!. O programa encontrou como única fase, o β-TCP, de acordo com o banco de dados JCPDS 9-0169 com 93% de grau de ajuste e um bom valor para o fator de concordância (R_p < 25). Isso indica que a adição de alginato e a incorporação de estrôncio não alteram a estrutura cristalina do fosfato tricálcico, nem induzem a formação de outras fases.

O espectro de infravermelho das microesferas ALG/β-TCP/Sr produzidas pode ser observado na Figura 24. Comparando-se o espectro das microesferas com o do alginato, há um pequeno deslocamento na posição das bandas características do alginato (região de 1594 e 1406 cm^{-1}) e uma considerável diminuição de intensidade. As bandas em 1604 (ν COO^-) e 1419 cm^{-1} (ν CO) aparecem em maiores números de onda. Segundo TAMPIERI *et al*. (2005) e XIE *et al.*(2010), esses efeitos podem estar relacionados com a interação química entre os íons cálcio da parte mineral e os oxigênios da carboxila do grupo GG (unidades do ácido α-L-gulurônico) da matriz orgânica. Além disso, pode haver também uma interação química do íon estrôncio presente na fase inorgânica com os íons COO^- do alginato.

A presença das bandas em 1115, 1100, 1080, 1010, 971 e 945 cm^{-1} são atribuídas ao modo vibracional ν_3 do grupo PO_4^{3-}. As bandas em 603 e 590 cm^{-1} se referem ao ν_4 do PO_4^{3-} do β-TCP.

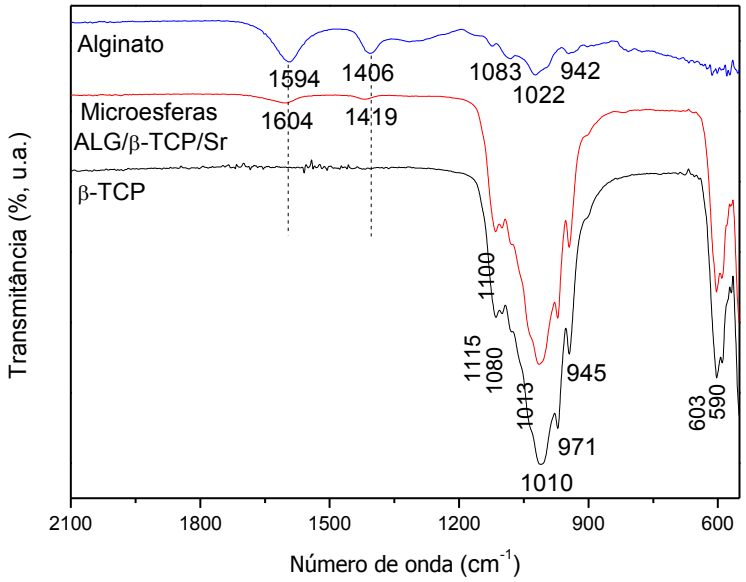


Figura 24: Espectro de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}).

A morfologia das microesferas de ALG/β-TCP/Sr é mostrada na Figura 25a. As microcápsulas apresentam superfície rugosa e é possível observar que o β-TCP está interligado na matriz do alginato e que essa matriz é do tipo porosa (Figura 25b). Mesmo apresentando uma superfície irregular porosa, não se observam trincas nas microesferas produzidas o que seria indesejável visto que aumentaria a tendência à erosão das partículas. Cabe lembrar que uma das aplicações possíveis dessas microcápsulas é em sistemas de liberação controlada.

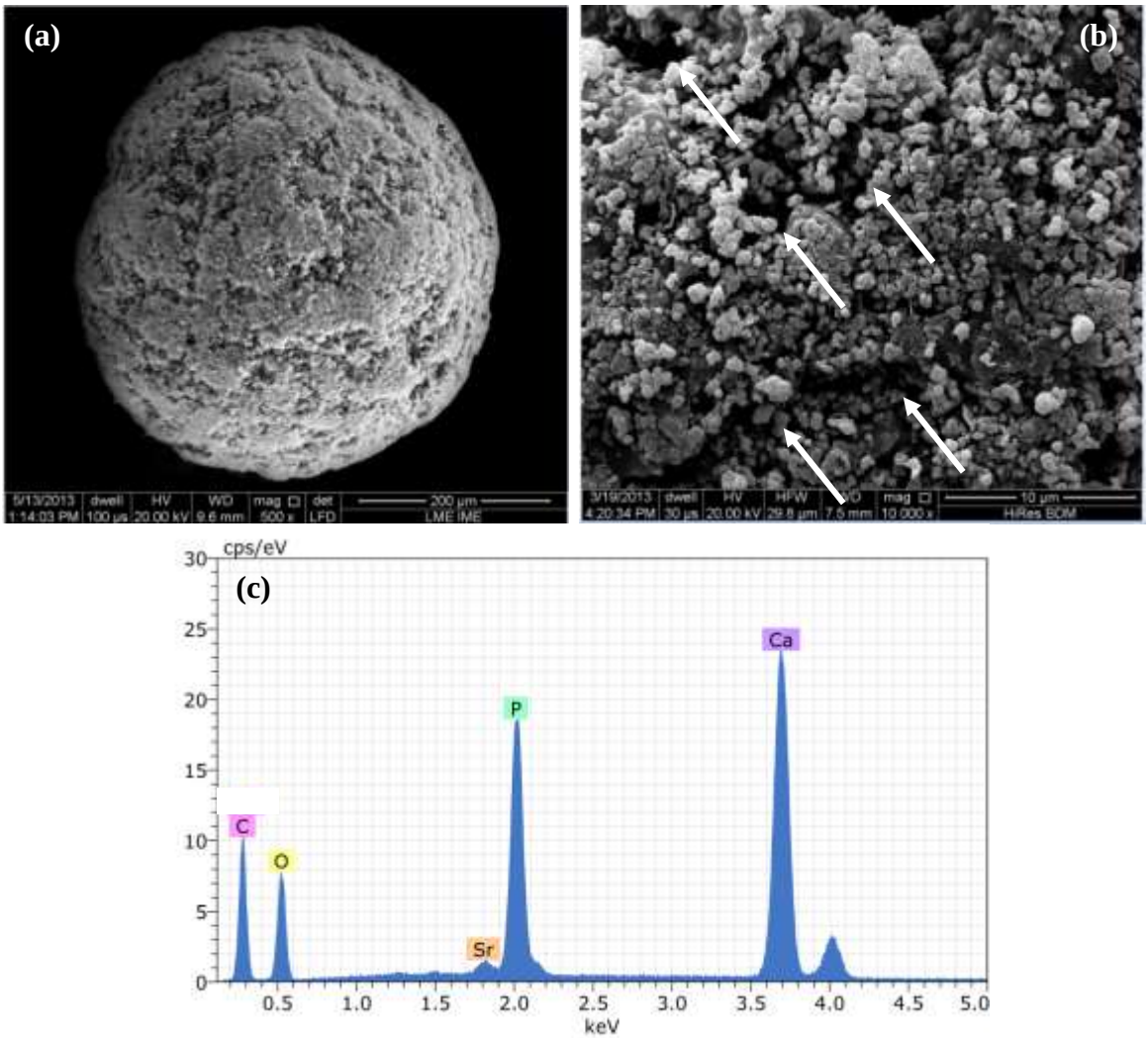


Figura 25: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}): (a) Aumento de 500x, (b) Aumento de 10.000x, mostrando em detalhe a presença de poros na escala de 1 a 1,5 µm e (c) Espectro de EDS.

A presença do íon estrôncio nas microesferas produzidas foi confirmada por EDS (Figura 25c). De um modo geral, escolhendo-se aleatoriamente as microesferas, elas são homogêneas e apresentam similar distribuição do íon Sr. Como a análise de EDS identificou a presença do íon Sr na composição das microcápsulas, pode-se inferir que o método empregado para a incorporação desse íon foi eficaz.

No entanto, a análise de EDS da seção transversal das microesferas (Figura 26) não identificou a presença do íon Sr, próximo ao centro das esferas. Essa observação demonstra que o íon estrôncio está presente preferencialmente na superfície externa das microesferas.

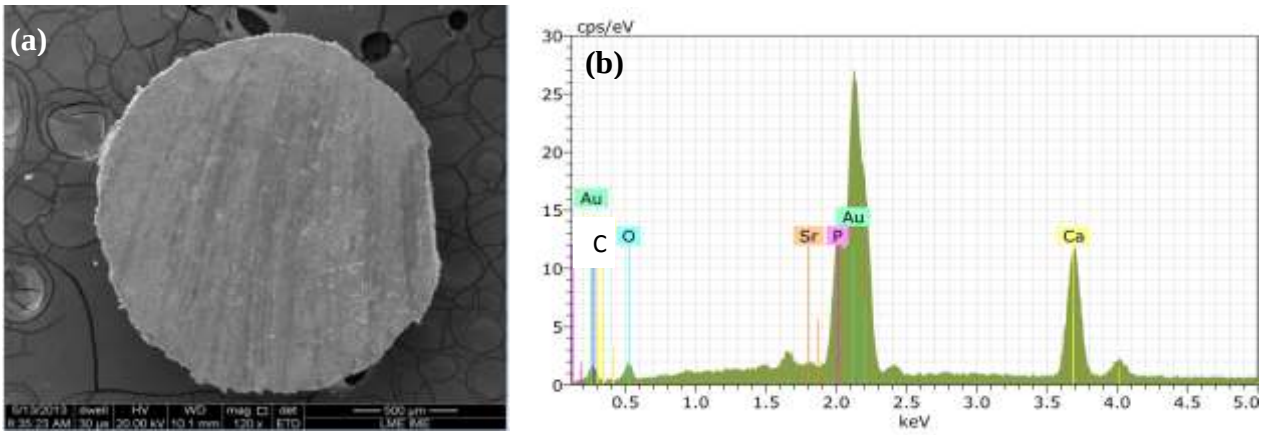


Figura 26: (a) Micrografia da seção transversal das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}) e (b) Espectro de EDS da seção transversal.

A formação das microcápsulas ocorre, instantaneamente, quando a suspensão de ALG/β-TCP entra em contato com a solução de cloreto de estrôncio, enrijecendo a superfície externa das esferas. Nesse caso, o agente gelificante é o íon Sr^{2+} que possui raio iônico um pouco maior que o Ca^{2+}, o agente gelificante comumente empregado. Assim, durante o processo de gelificação, a troca iônica dos íons Na^{+} com íons Sr^{2+} resulta na formação de uma ligação cruzada em que o estrôncio permanece mais na superfície que no interior das esferas, pois como se trata de um íon grande, ele aumenta a barreira difusional, dificultando sua migração para o interior da esfera. Além disso, como a reticulação ocorre via um processo de difusão onde os íons presentes na solução reticulante se difundem para a solução de alginato num processo que ocorre de fora para dentro, há também um retardamento da reticulação no interior das esferas. Sendo assim, há um gradiente de concentração do agente reticulante quando se caminha da extremidade para o interior da esfera (GOH, HENG, CHAN, 2012; PAWAR & EDGAR, 2012).

A curva de TG/DTG das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas está apresentada na Figura 27. É possível identificar três regiões de perda de massa: a primeira perda ocorre na faixa de 30-180 ^{o}C, a segunda na faixa de 210-500 ^{o}C e a terceira na faixa de 560-800 ^{o}C. O primeiro estágio de perda de massa está associado à saída de água do material (1 %). O segundo corresponde à decomposição do alginato (3,2 %), que pode ocorrer inicialmente, na fragmentação e formação de monômeros até a degradação completa do polímero. O último estágio de perda de massa é devido à transformação de fase de alguma fração de apatita não estequiométrica para β-TCP (1 %) (IGNJATOVIĆ *et al*., 2007; SON *et al*., 2012; TAMPIERI *et al*., 2005). Diante das perdas ocorridas, o resíduo resultante corresponde a 94,8 %.

Através da análise do termograma para as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas pode-se verificar que elas são termicamente estáveis até a temperatura de 800 ^{o}C, sendo eliminado somente o alginato. Essa estabilidade se deve à forte atração eletroestática dos íons Ca^{2+} e Sr^{2+} com as carboxilas do alginato. Mesmo após a decomposição do alginato, as microesferas ainda mantêm sua forma esférica, porém tornam-se mais quebradiças. ROSSI *et al.* (2012) relatam que o compósito HA/ALG apresenta melhores resultados de biomineralização e biointegração após implantação por 90 dias com o tecido neoformado quando comparado ao emprego da HA sem o alginato (compósito HA/ALG sinterizado). Houve um crescimento de uma camada mineralizada na vizinhança do implante contendo o compósito ALG/HA, não sendo observado ao redor do implante contendo o compósito sinterizado.

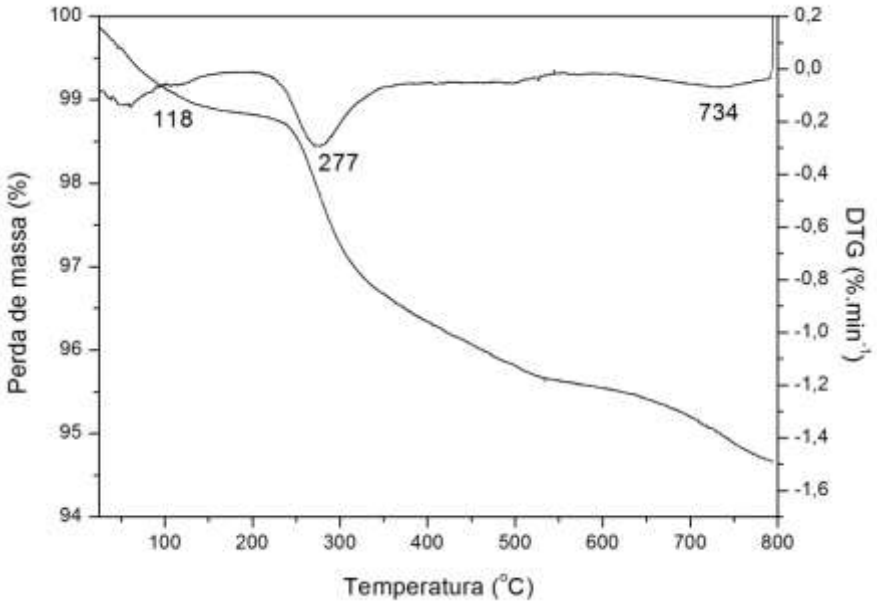


Figura 27: Curva de TG/DTG das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}).

5.2.2 Microesferas produzidas pela incorporação do íon estrôncio empregando solução mais concentrada de cloreto de estrôncio (1,50 mol.L^{-1})

A produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando uma solução de cloreto de estrôncio 10 vezes mais concentrada que a anterior (1,50 mol.L^{-1}) foi obtida com 96 % de rendimento. A distribuição dos diâmetros das esferas produzidas está mostrada na Figura 28. Nesse caso, somente 7 % das microesferas se encontram na faixa granulométrica de interesse (355-420 μm).

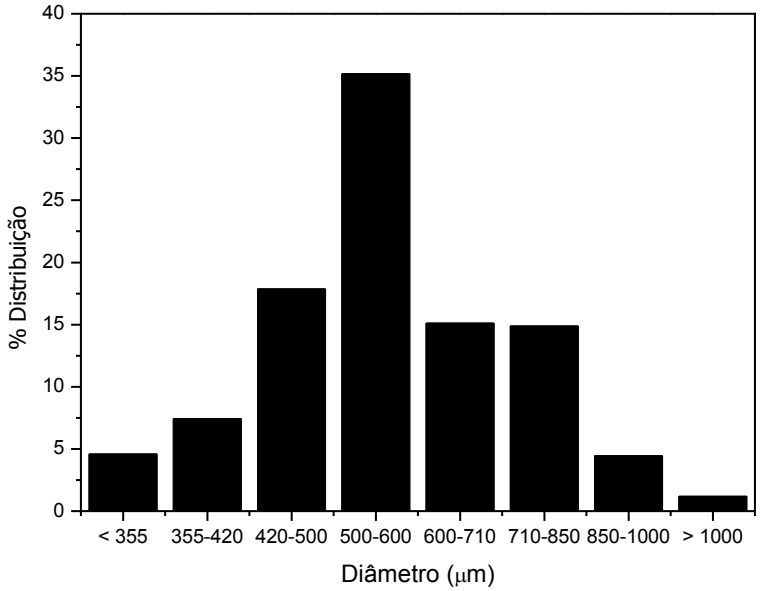


Figura 28: Distribuição de tamanho das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de cloreto de estrôncio (1,50 mol.L^{-1}).

LUPO *et al.* (2014) constataram que a distribuição de tamanho das esferas produzidas não é afetada pela concentração da solução reticulante e sim pela natureza do sal empregado como agente gelificante. Eles ainda relatam que a forma e a morfologia das esferas é que são afetadas por esses parâmetros.

Segundo ROY, BAJPAI e BAJPAI (2009), o emprego de uma solução mais concentrada do agente reticulante implica num aumento do grau de reticulação e numa diminuição do tamanho das esferas. Semelhante comportamento foi observado por SHI *et al.* (2011). Soluções concentradas tem maior condutividade elétrica atuando na gota de alginato que entra em contato com a solução.

No entanto, a Figura 28 não reflete esse comportamento. Uma explicação para esse fato pode ser devido à velocidade de extrusão. Uma velocidade muito rápida faz com que mais alginato esteja presente nas esferas e com isso, aumente seu tamanho (SHI *et al.*, 2011).

O difratograma das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada pode ser observado na Figura 29a. Observa-se que os picos de difração para as microesferas produzidas estão levemente deslocados para valores de 2θ maiores em relação às

reflexões do β-TCP (Figura 29b). Porém, esse deslocamento é menor quando comparado com as microesferas produzidas empregando solução menos concentrada de $SrCl_2$ 0,15 mol.L^{-1}. Nota-se que os picos de difração para as esferas produzidas empregando solução de $SrCl_2$ mais concentrada apresentam menor intensidade e maior largura total a meia altura (FWHM, *full width at half height*) quando comparados ao material de partida, sendo produzido então um material de menor cristalinidade, o que irá refletir em sua solubilidade. Provavelmente, o fato da solução reticulante ser mais concentrada, ocasionaria numa maior incorporação de estrôncio às microesferas, conduzindo a uma maior desorganização estrutural, o que se reflete no perfil de difração.

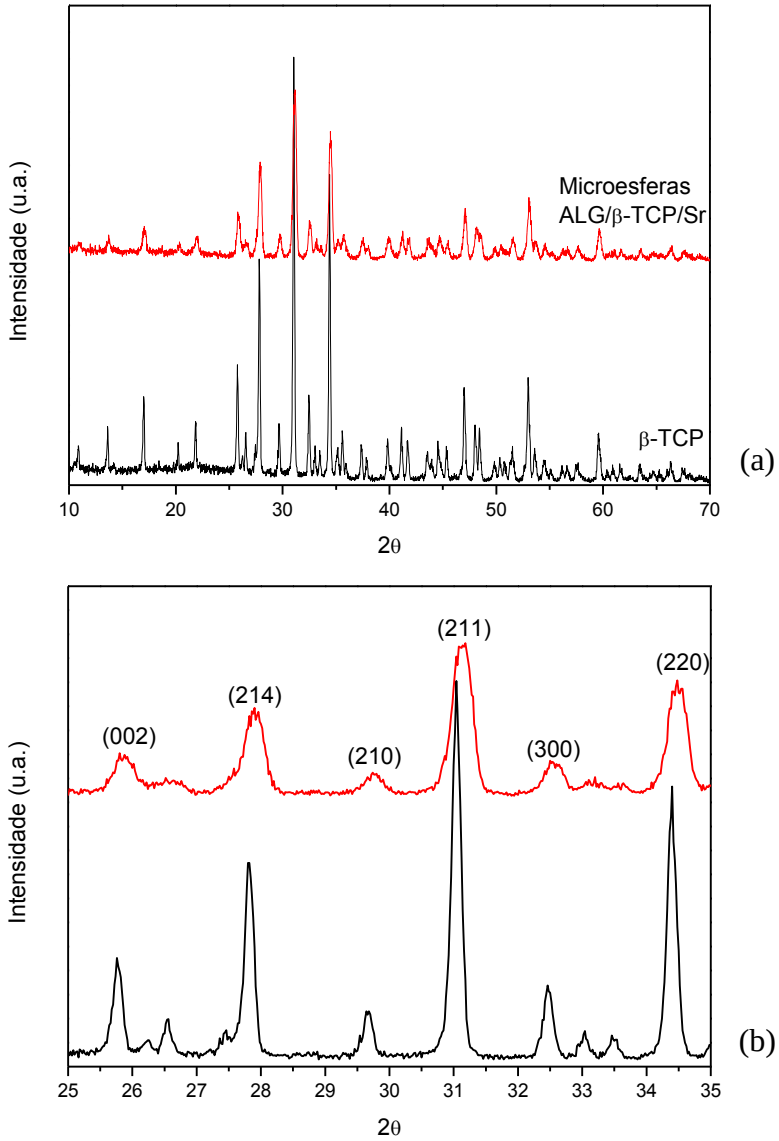


Figura 29: a) DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de cloreto de estrôncio (1,50 mol.L^{-1}) e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º).

O difratograma das microesferas de ALG/β-TCP/Sr foi analisado e o programa encontrou como única fase presente nas microesferas, o β-TCP, de acordo com o banco de dados JCPDS 9-0169 com 90 % de grau de ajuste.

O espectro de infravermelho das microesferas ALG/β-TCP/Sr produzidas (não mostrado), não apresentou nenhuma diferença significativa com relação às bandas características do alginato e do fosfato como já discutido anteriormente.

A morfologia das microesferas de ALG/β-TCP/Sr pode ser vista na Figura 30a. As microcápsulas apresentam superfície menos rugosa que as anteriores e mais uma vez é possível observar as partículas esféricas do β-TCP bem interligadas e homogeneamente dispersas na matriz porosa do alginato (Figura 30b).

O íon estrôncio foi incorporado nas microesferas, o que pode ser confirmado por EDS (Figura 30c). Qualitativamente, não se pode dizer que neste caso, houve uma maior inserção de Sr às microesferas. Somente os resultados de análise química dirão se o emprego de uma solução mais concentrada do agente reticulante implica numa maior incorporação de estrôncio.

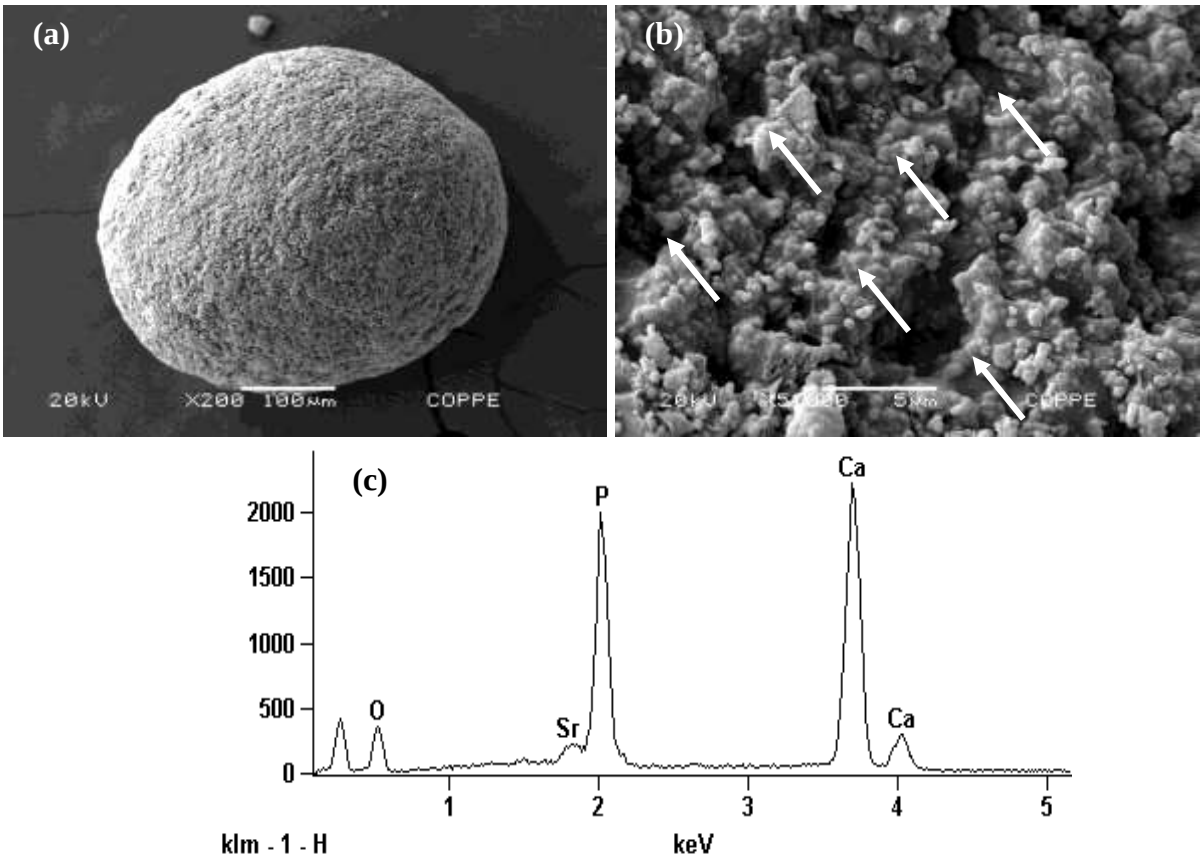


Figura 30: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de cloreto de estrôncio (1,50 mol.L^{-1}): (a) Aumento de 200x, (b) Aumento de 5.000x, mostrando em detalhe a presença de poros na escala de 1 a 1,5 µm e (c) Espectro de EDS.

5.2.3 Análise química das microesferas produzidas através da incorporação do íon estrôncio empregando solução de cloreto de estrôncio

A quantificação do íon estrôncio presente nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas foi feita através da Espectrofotometria de absorção atômica por chama via dois processos: método direto e método indireto.

O método direto consiste em realizar a abertura das microesferas produzidas conforme descrito no item 4.4.1 e fazer a leitura da concentração de cálcio e estrôncio por EAA. No método indireto, durante o processo de produção das microesferas, todas as soluções utilizadas e remanescentes foram analisadas por EAA.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a média dos valores encontrados em ambos os processos está apresentada na Tabela 6 (método direto, abertura das microesferas e leitura da concentração de Ca e Sr) e 7 (método indireto, leitura da concentração de cálcio e estrôncio nas soluções após a produção).

Tabela 6: Concentração de Ca e Sr obtidas pelo método direto (abertura da amostra e leitura por EAA) a partir das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas.

Microesferas produzidas	**Concentração Ca (%)**	**Concentração Sr (%)**
$SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1})	26,53 ± 0,66	1,18 ± 0,050
$SrCl_2$ (1,50 mol.L^{-1})	15,14 ± 0,5	0,85 ± 0,0035

A Tabela 6 mostra que a quantidade de estrôncio incorporada empregando solução de $SrCl_2$ concentrada foi menor. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que o processo de gelificação neste caso ocorre a uma taxa mais rápida. Quando a suspensão ALG/β-TCP entra em contato com a solução de alta concentração de estrôncio, como maior é o grau de reticulação, há uma maior interação e atração eletrostática do íon com as carboxilas do alginato (KUO e MA, 2001). Assim, cria-se instantaneamente, uma barreira difusional fazendo com que menos íon estrôncio participe das ligações cruzadas e consequentemente, menor quantidade é incorporada.

Tabela 7: Concentração de Ca e Sr obtida pelo método indireto (leitura das soluções antes de depois da produção por EAA) a partir das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas.

Microesferas produzidas com $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1})	**Concentração Ca (mg.L^{-1})**	**Concentração Sr (mg.L^{-1})**
Solução inicial $SrCl_2$ (teórica)	-	$13,14.10^3$
Solução inicial $SrCl_2$ (experimental)	-	$12,55.10^3$
Solução Pós-Produção	10,07 ± 0,49	$11,68.10^3$ ± 111
Água de Lavagem	1,50 ± 0,20	848,0 ±112

De acordo com os resultados da Tabela 7, observa-se que a concentração de estrôncio experimental para a solução original de $SrCl_2$ está bem próxima do valor teórico. A diferença pode ser justificada devido aos elevados valores de concentração que implicam em diluições grandes e, consequentemente, maiores erros na análise.

Comparando os valores da concentração de Sr nas soluções inicial e pós-produção, verifica-se que houve uma diminuição de sua concentração após a formação das microesferas, indicando assim que menos Sr estaria em solução e que uma parte dele de fato foi incorporada. Pela diferença da concentração da solução inicial e das duas soluções (pós-produção e água de lavagem), considera-se que 20,5 mg.L^{-1} de Sr teriam sido incorporados.

O resultado obtido para a concentração de Sr pelo método indireto (2,05 %) é um pouco diferente do valor encontrado pelo método direto (1,18 ± 0,05 %). Porém, considerando todas as manipulações feitas durante o processo de produção das microesferas, como também para sua abertura, os valores estão dentro da mesma ordem de grandeza, e por isso, podem ser considerados relevantes.

Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o método para abertura das amostras. Talvez, a metodologia empregada na abertura das amostras não seja

suficientemente efetiva, pois se verifica um resíduo de microesferas mesmo após sua abertura. Esse resíduo pode conter alguma quantidade de estrôncio, indicando que no processo de abertura das amostras há perda de estrôncio. Por esse motivo, provavelmente, os valores da concentração de estrôncio encontrados por EAA são menores que os valores reais.

A maior quantidade de estrôncio contida nas microesferas (1,18%) equivale a uma concentração de estrôncio igual a 0,14 $mmol.L^{-1}$ e pode ser considerada baixa. Porém, mesmo em pequenas concentrações, estudos mostram o efeito benéfico do Sr na ação dos osteoblastos e osteoclastos (NIELSEN, 2004; VERBERCKMOES, DE BROE e D'HAESE, 2003). Entretanto, o valor obtido é bem próximo ao encontrado por DELANNOY, BAZOT, MARIE (2002), onde doses plasmáticas de 0,181 $mmol.L^{-1}$ mostraram aumento do volume ósseo.

5.3 TESTES *IN VITRO* DE DISSOLUÇÃO E LIBERAÇÃO DE ESTRÔNCIO

As microesferas de ALG/β-TCP/Sr obtidas empregando solução de cloreto de estrôncio menos concentrada (0,15 $mol.L^{-1}$) foram submetidas aos testes *in vitro* de dissolução e liberação de estrôncio e cálcio conforme descrito no item 4.5. Os dados experimentais apresentados correspondem a uma média dos três valores encontrados através da realização dos ensaios em triplicata.

Após as microcápsulas ficarem em contato com a solução tampão, ao final de todos os tempos de estudo, a solução apresentava aspecto leitoso, indicando que houve uma dissolução parcial das microesferas de ALG/β-TCP/Sr.

A concentração acumulada de cálcio e estrôncio liberada após cada intervalo de tempo é mostrada na Figura 31. Os testes *in vitro* mostraram que em 24 horas, em ambos os valores de pH testados, há um aumento da concentração de cálcio e estrôncio liberadas na solução, indicando uma rápida e máxima liberação desses íons. Resultados semelhantes foram relatados por SUGANTHI *et al.* (2011), onde essa rápida e máxima liberação inicial (*burst release*) pode ser usada em sistemas de liberação controlada de antibióticos a fim de evitar um processo inflamatório após uma cirurgia.

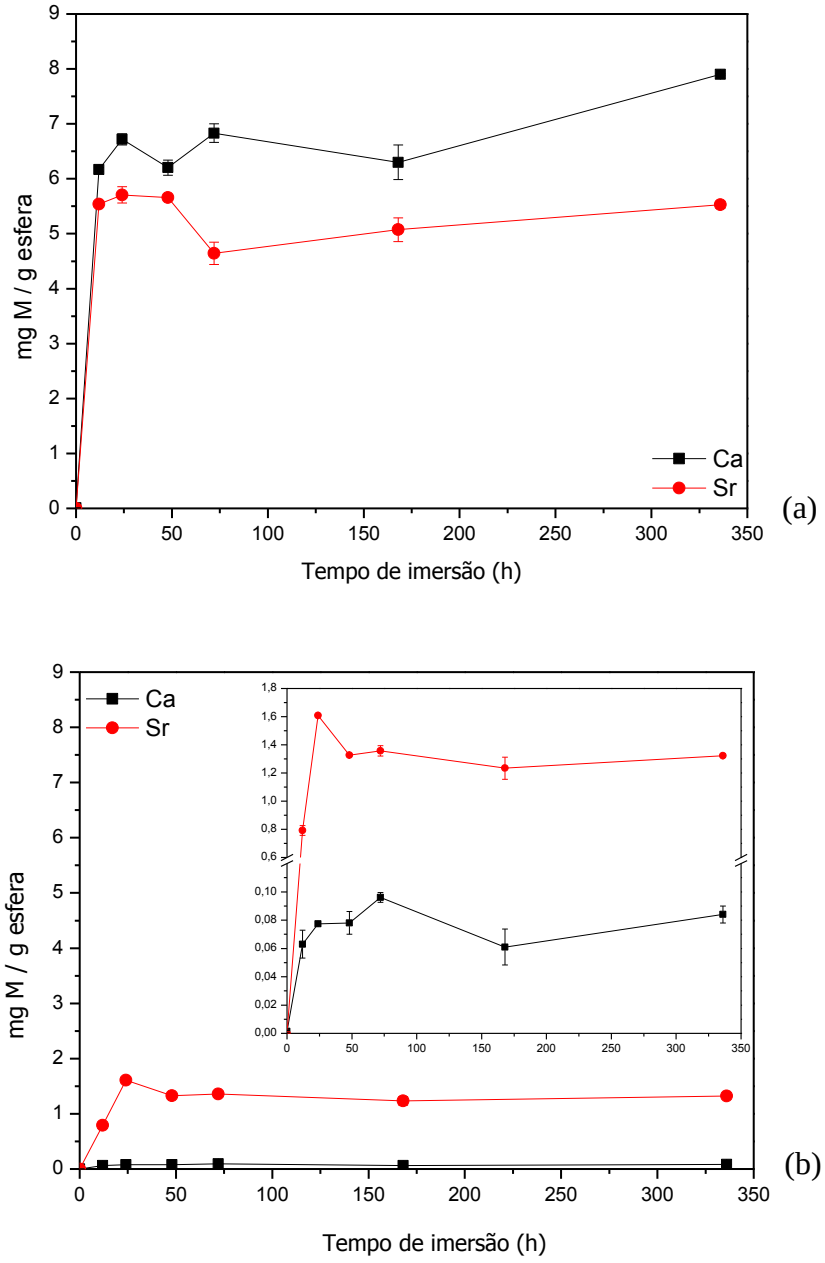


Figura 31: Perfil de liberação acumulativa de cálcio e estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) em função do tempo de imersão: (a) pH 4,0 e (b) pH 7,4 e detalhe em menor escala do perfil de liberação de Ca e Sr. M = Ca ou Sr.

Vale lembrar que os testes foram realizados com microesferas de diâmetros na faixa de 355-420 μm, que são favoráveis ao processo de dissolução, devido à alta superfície de contato. Após 24 h de imersão, há uma diminuição das concentrações de cálcio e estrôncio no meio e, após 72 h, o decréscimo é mais significativo em pH 4,0.

Baseado em estudos anteriores (SÁNCHEZ-SALCEDO *et al*., 2009), durante a dissolução do β-TCP ocorre inicialmente a liberação de íons Ca^{2+}, Sr^{2+} e PO_4^{3-} para o meio. Com o aumento do tempo de imersão, a concentração desses íons aumenta até que a solução se torna supersaturada, o que pode resultar na precipitação de uma nova fase de fosfato de cálcio, seguindo como, por exemplo, as equações 2.1 a 2.5. O processo de precipitação é responsável por diminuir as concentrações de cálcio e estrôncio após 24h (DOROZHKIN, 2002). Este processo de dissolução-precipitação ocorre até que o equilíbrio seja atingido, onde, depois de 7 dias, não ocorre mais nenhuma liberação de estrôncio.

Os perfis de liberação de cálcio e estrôncio exibem uma similar tendência. Comparando ambas as condições (pH 4,0 e 7,4), a liberação dos íons é mais pronunciada em pH 4,0 devido à maior dissolução dos fosfatos de cálcio em ambiente ácido, como pode ser visto na Figura 31a (GENTLEMAN *et al., 2010).*

A razão molar Sr/Ca permanece quase constante e igual a 0,8 durante todo o experimento, indicando que a taxa de liberação de Sr é aproximadamente igual a de Ca, devido à dissolução do β-TCP. A liberação dos íons ocorre apenas no início e, após o *burst release* inicial, a razão molar Sr/Ca permanece inalterada. Isso significa que grande parte do estrôncio presente nas microesferas foi liberado em 24 horas.

No entanto, no pH 7,4 (Figura 31b), há uma maior liberação de estrôncio quando comparada com a liberação de cálcio. Esse resultado corrobora com o fato de que os íons Sr estão preferencialmente localizados na superfície das microesferas. O pH 7,4 não é agressivo e não promove a dissolução do β-TCP, mas favorece a perda da reticulação. Isso ocorre devido as carboxilas do alginato encontrarem-se ionizadas nesse pH (pKa MM = 3,38 e pKa GG = 3,65) (SARMENTO *et al.*, 2006). Portanto, segundo o processo de difusão e ruptura das ligações coordenadas entre os grupos carboxilatos do alginato com o íon estrôncio, ele é facilmente liberado das microesferas e o perfil de liberação dos íons segue também todas as fases mencionadas anteriormente (dissolução-precipitação), sendo que este processo é

favorecido pelo fator de inchamento das microesferas. O processo de intumescimento será melhor discutido no item 5.6.

Segundo o mecanismo proposto por BAJPAI e SHARMA (2004), a dissolução das microesferas de ALG/β-TCP/Sr, independente do pH, parece seguir as seguintes etapas: quando as microcápsulas são colocadas em contato com a solução tampão, os íons sódio presentes na solução iniciam um processo de troca iônica com os íons cálcio e estrôncio ligados aos grupos COO^- das unidades MM do alginato. Assim, a fase inicial é o inchamento das microcápsulas e difusão de cálcio e estrôncio para o meio. Ao mesmo tempo, uma leve dissolução do β-TCP ocorre juntamente com a liberação de íons fosfato. Com o aumento do tempo de imersão, as microesferas incham ainda mais e a cadeia polimérica fica mais relaxada. Ocorre então a troca iônica com os íons cálcio e estrôncio mais estáveis e que se encontram ligados mais fortemente com os grupos COO^- das unidades GG. Quando o processo de intumescimento atinge o máximo, a fase final é alcançada e ocorre o colapso da matriz devido à perda da estrutura "*egg-box*" causada pelo rompimento das ligações cruzadas do polímero e liberação dos íons cálcio e estrôncio (processo de erosão).

Em função do pH da solução tampão, a taxa de dissolução das microesferas e liberação do íon estrôncio pode ser maior devido à dissolução do β-TCP em pH ácido ou devido ao processo de erosão da matriz polimérica em pH 7,4.

Sendo assim, o comportamento de dissolução e liberação de estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr, tanto no pH 4,0 como no pH 7,4, segue um perfil de liberação em uma única etapa: liberação linear máxima em até 24h. Esse perfil caracteriza o modelo proposto por Higuchi que descreve o mecanismo de cinética de dissolução/liberação sendo governado pelo processo de difusão (DASH *et al.*, 2010).

Através do gráfico é possível observar que em 24h ocorre o máximo de liberação do íon estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr. Essa liberação corresponde a 48% para o pH 4,0 e 14% para o pH 7,4 do total do Sr presente nas microesferas. Esse comportamento deve ser levado em consideração quando se deseja empregar esse tipo de compósito em enxertos ósseos.

A Figura 32 mostra a massa (em mg) de estrôncio por grama de esfera presente nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr após os diferentes tempos de imersão. Ou seja, o gráfico indica a quantidade remanescente de estrôncio nas microesferas após o teste *in vitro*. Verifica-se que quase todo Sr contido nas microcápsulas foi liberado em pH 7,4 e que ainda resta uma pequena parte no pH 4,0.

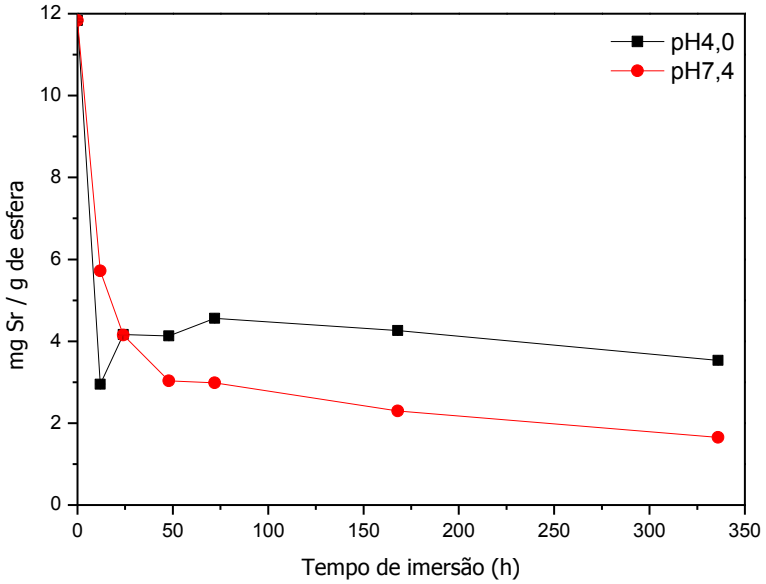


Figura 32: Massa de estrôncio presente nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após diferentes tempos de imersão.

O perfil apresentado nos dois pHs reflete o mecanismo proposto, onde há uma maior liberação de Sr e, consequentemente, menor quantidade do íon presente nas microesferas remanescentes em pH 7,4. Como dito anteriormente, nesse pH há perda da reticulação pelo rompimento das ligações cruzadas e estando o íon Sr^{2+} ligado às carboxilas do alginato, ele seria rapidamente liberado. Porém, esses dados não coincidem com o que foi observado no perfil de liberação acumulativa (Figura 31), onde houve uma liberação de apenas 48% e 14% do estrôncio contido nas microesferas no pH 4,0 e 7,4, respectivamente. Esperava-se que mais Sr estivesse presente nas microcápsulas remanescentes. Como a concentração de Sr é inferior ao esperado, isso indica que o processo de abertura das amostras estaria de fato influenciando

no resultado das análises, fornecendo um valor de concentração menor, pois parte do estrôncio ainda estaria incorporado às microesferas mesmo após o procedimento de abertura. Por esse motivo, optou-se por apresentar nos resultados seguintes, somente os dados do perfil de liberação acumulativa, em que a análise da concentração de estrôncio é feita diretamente no fluido.

A variação de pH durante os testes *in vitro* é mostrada na Figura 33. Observa-se que ao longo do experimento há uma pequena variação no pH da solução tampão e essa diferença é maior no ensaio a pH 4,0. Essa mudança de pH pode ser explicada pela dissociação do β-TCP e formação das espécies segundo as equações 2.1 a 2.4. Com a dissolução do β-TCP em meio ácido, ocorre uma liberação de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} além de um consumo de íons H^+ do meio para a formação de HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$. Por esses motivos, o pH aumenta. Em seguida, com a formação da espécie H_3PO_4 no meio, o pH volta a cair. Quando o equilíbrio entre as espécies presentes é atingido, o pH da solução fica constante (ZOU *et al.*, 2011).

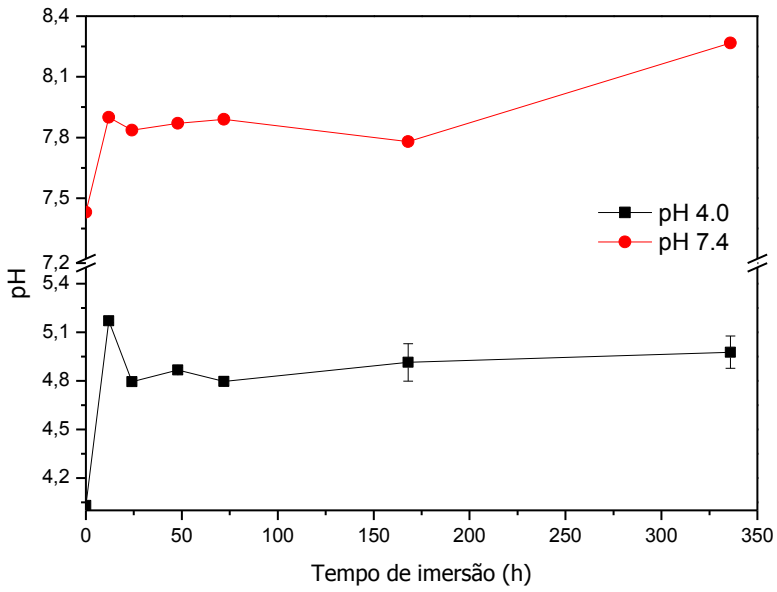


Figura 33: Variação de pH durante os testes *in vitro* das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0m,15 mol.L^{-1}).

A Figura 34 apresenta os padrões de DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr resultantes dos testes *in vitro* em pH 4,0. Os difratogramas das amostras nos diferentes tempos de imersão mostram perfis de difração similares entre si. Porém, comparando-os com o difratograma das microesferas antes do ensaio, houve um deslocamento para menores valores de 2θ assemelhando-se ao perfil de difração do β-TCP. Além disso, houve uma diminuição de intensidade e alargamento dos picos principais, o que seria indicativo da presença de uma apatita pouco cristalina, dados que reforçam o processo de dissolução-precipitação decorrente do ensaio *in vitro*. Porém, o software Match! detectou com 89% de grau de ajuste que a única fase cristalina presente é o β-TCP em todas as amostras. Provavelmente, a quantidade da nova fase precipitada que estaria presente nas microesferas é inferior a quantidade que conseguiria ser detectada por DRX. Para os testes realizados em pH 7,4, as mesmas observações foram feitas e por isso, os difratogramas das amostras não foram apresentados.

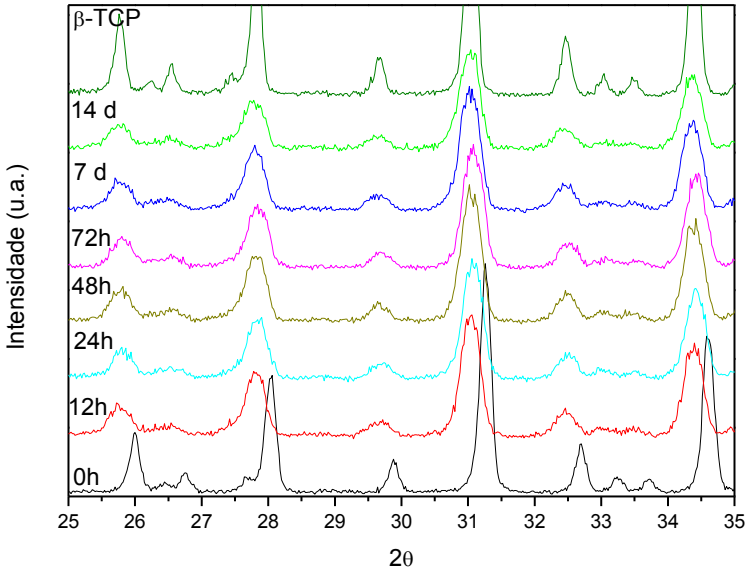
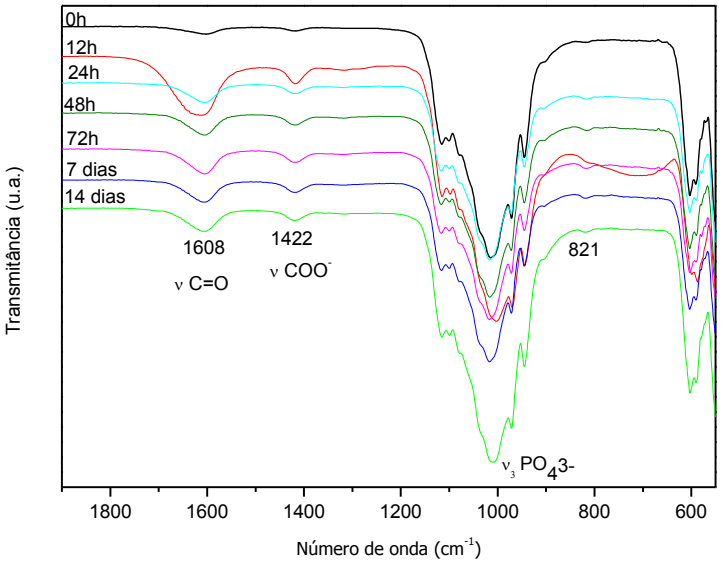


Figura 34: Difratograma de raios X das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após o ensaio de dissolução em pH 4,0.

Os espectros de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr após o ensaio de dissolução em pH 4,0 e 7,4 podem ser observados nas Figuras 35a e 35b, respectivamente. É possível verificar em ambos os casos que as bandas referentes à carbonila (C=O) e carboxila (COO^-) do alginato ficaram mais largas e intensas. Considerando o pH 4,0, isso provavelmente se deve ao processo de intumescimento das microesferas ao longo do tempo, juntamente com o fato de que menos β-TCP estaria compondo as microcápsulas devido a sua dissolução, tornando mais evidente essas bandas. Já em pH 7,4, o processo de intumescimento das microesferas é maior promovendo a relaxação da cadeia polimérica e aumentando a mobilidade das ligações químicas, de modo que a vibração na região específica dessas bandas fique mais pronunciada.



(a)

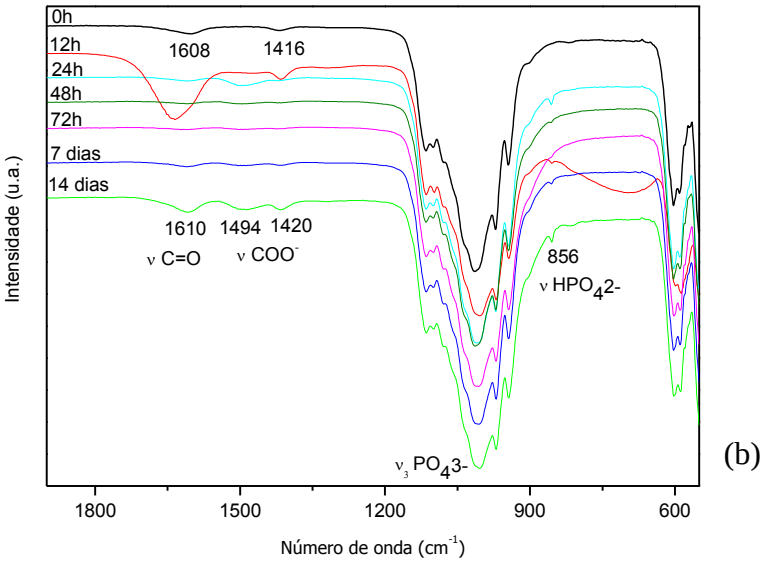


Figura 35: Espectro de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após o ensaio de dissolução: (a) pH 4,0 e (b) pH 7,4.

Observa-se ainda o aparecimento de uma banda em 1494 cm^{-1} característica do grupo carbonato em 14 dias de imersão em pH 7,4. Os íons CO_3^{2-} são incorporados, principalmente, nesse pH, pois a medida que o valor de pH aumenta, a presença do íon carbonato é favorecida na solução tampão. Resultados semelhantes foram relatados por SON *et al.* (2012).

Outra observação importante considerando o ensaio em pH 7,4 é o aparecimento da banda em 856 cm^{-1} a partir de 24h de imersão. Essa banda pode estar relacionada com o íon HPO_4^{2-}, presente em uma hidroxiapatita cálcio-deficiente, brushita, fosfato octacálcico, entre outras (JONG-SHING, BOW; SZ-CHIAN, LIOU e SAN-YUAN, CHEN; 2004). No ensaio realizado em pH 4,0, não é possível identificar banda nessa região. Porém, a partir de 24h de imersão, há o aparecimento de uma banda de pequena intensidade em 821 cm^{-1}, que também pode estar relacionada com o íon HPO_4^{2-}, segundo WILSON *et al.* (2005). A existência dessa banda seria um indicativo da precipitação de uma nova fase de fosfato de cálcio, comum em estudos de dissolução, em quantidade não detectável pela técnica de DRX.

Na Figura 36 estão ilustradas as imagens de MEV das microesferas de ALG/β-TCP/Sr após o ensaio de dissolução em pH 4,0. Em pH ácido, os grupos carboxilatos do alginato estão protonados e as cadeias poliméricas, mais relaxadas. Mesmo que a protonação impeça

de certa forma a absorção de água e, consequentemente, o inchamento, as microesferas ainda assim absorvem água, mas numa taxa lenta (BAJPAI e SHARMA, 2004; BAJPAI, SAXENA e SHARMA, 2006). O processo de gelificação é reversível e as microesferas não são estáveis em períodos extensos quando expostas à solução tampão. Ao longo do tempo, ocorre o rompimento das ligações coordenadas, liberando o íon estrôncio encapsulado para a solução. Por esta razão, em 24 e 48h, o tamanho das microesferas encontra-se maior quando comparado com o tempo zero, o que indica que ao longo do tempo em contato com a solução tampão, elas incham ainda mais. Em 7 dias, observa-se que houve um desgaste da camada mais externa das microesferas sugerindo o início do processo de erosão comum nos ensaios de dissolução. Aos 14 dias, verifica-se o colapso da matriz, com grande parte das microesferas fragmentadas. O processo de erosão nesse pH ocorre devido à perda da fração inorgânica pela dissolução do β-TCP, que ajudaria em manter a forma das microesferas.

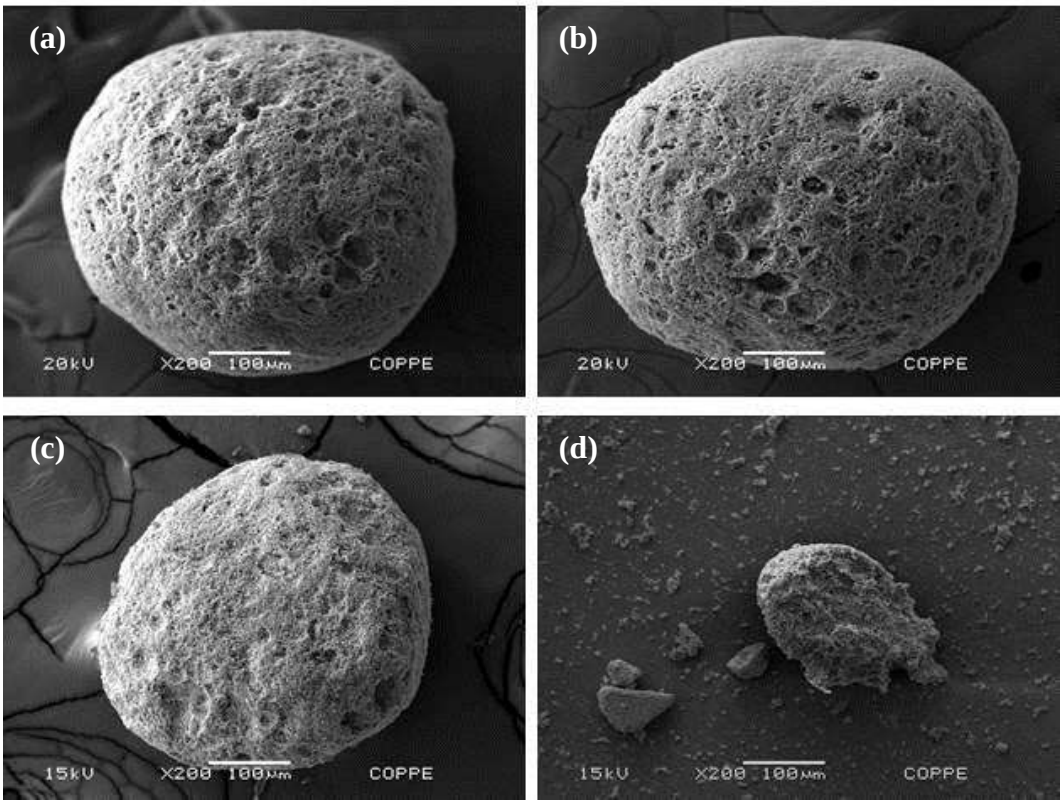


Figura 36: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após teste *in vitro* em pH 4,0 com diferentes tempos de imersão, aumento de 200x: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 7 dias e (d) 14 dias.

Analisando as imagens em maior aumento (Figura 37), nota-se a exposição da matriz polimérica do alginato (Figura 37a). Isso ocorre devido ao meio ácido promover a dissolução da fração inorgânica que compõe as microesferas, o β-TCP. Estes resultados corroboram com os dados apresentados nos testes de dissolução *in vitro*, onde se observou uma maior liberação de íons Ca^{2+} e Sr^{2+} para o meio. Após o ensaio de 14 dias (Figura 37b) verifica-se a presença de uma segunda fase com morfologia de placas. Tanto as fases brushita (DCPD) como o fosfato octacálcico (OCP) apresentam morfologias de placas (KAILI LIN, CHENGTIE WU, JIANG CHANG (2014); TOSHIMA *et al*., 2014), compatíveis com o observado nas imagens de MEV.

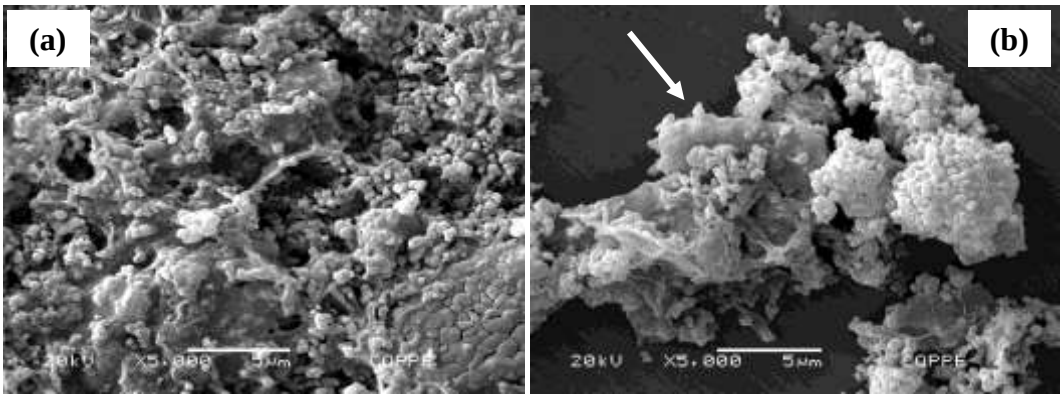


Figura 37: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após teste *in vitro* em pH 4,0 com aumento de 5.000x: (a) 24 h e (b) 14 dias. Detalhe para o aparecimento de placas.

As micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr após o ensaio de dissolução em pH 7.4 podem ser vistas na Figura 38. Em pH fisiológico, as cadeias poliméricas de alginato tendem a absorver mais água e inchar rapidamente. Em 24h percebe-se que as microesferas perdem a forma arredondada tornando-se mais alongada. Com o aumento do tempo de imersão, praticamente em 48h, inicia-se o processo de erosão da matriz polimérica. Por esta razão, após 7 dias de imersão, as microesferas se apresentam reduzidas e bem desgastadas. Ao final dos 14 dias ocorre a ruptura da estrutura "*egg-box*" similar ao observado por BAJPAI e SHARMA (2004) e BAJPAI, SAXENA e SHARMA (2006). Nesse caso, o processo de erosão ocorre devido ao rompimento das ligações coordenadas causado pela elevada taxa de intumescimento, que mantém a forma esférica das microesferas.

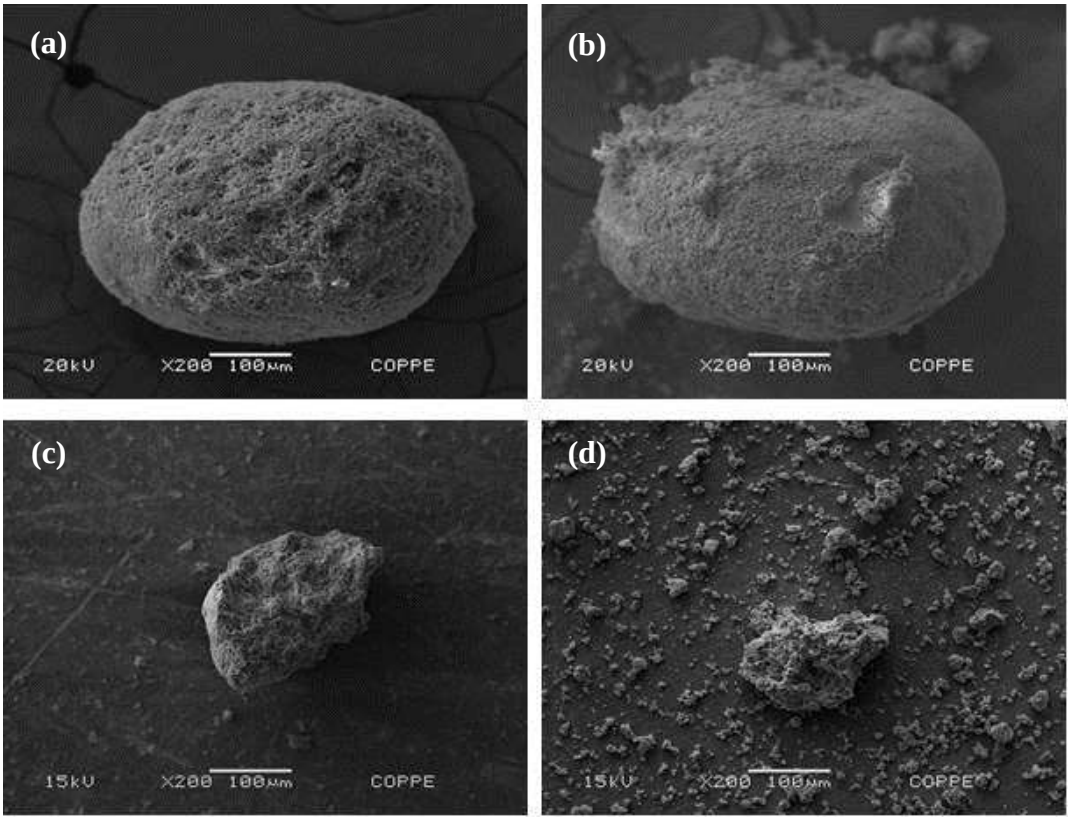


Figura 38: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após teste *in vitro* em pH 7,4 com diferentes tempos de imersão, aumento de 200x: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 7 dias e (d) 14 dias.

Analisando as micrografias de maior aumento (Figura 39) observam-se nitidamente as partículas arredondadas do β-TCP e não mais a matriz polimérica (Figura 39a). Estes resultados corroboram com o mecanismo de dissolução proposto, onde em pH 7.4 ocorre uma maior liberação dos íons Sr^{2+}, uma vez que estão eletrostaticamente ligados ao alginato e a fase fosfato não é praticamente afetada nesse pH. Na Figura 39b verifica-se o aparecimento de uma segunda fase com morfologia de placas corroborando com o resultado obtido por FTIR em que as bandas de HPO_4^{2-} são identificadas (Figura 35b).

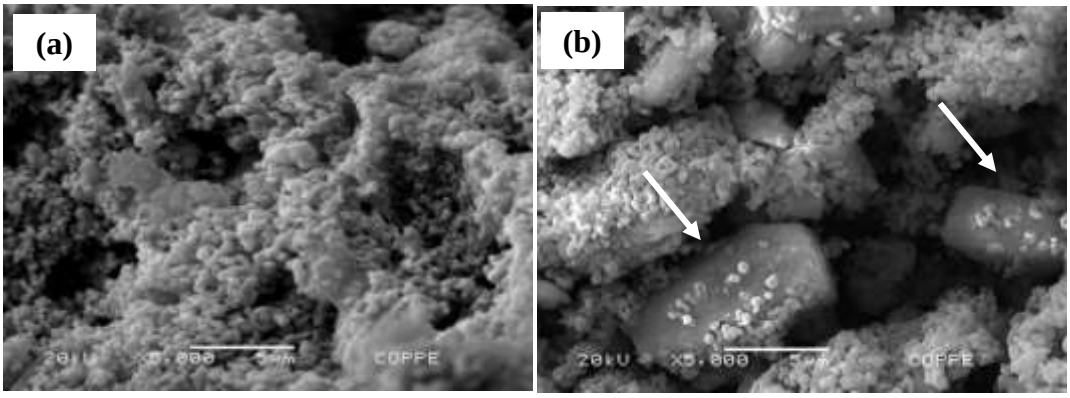


Figura 39: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}) após teste *in vitro* em pH 7,4 com aumento de 5.000x: (a) 24 h e (b) 14 dias. Detalhe para o aparecimento de placas.

Para as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando-se uma solução concentrada de $SrCl_2$ (1,50 mol.L^{-1}) foi realizado apenas o teste de liberação em 24h de imersão (Figura 40). No pH 4,0, há uma liberação similar de cálcio e estrôncio cuja razão molar Sr/Ca é igual a 0,85. Como o meio é ácido, as carboxilas do alginato encontram-se protonadas, diminuindo a taxa de inchamento. Porém, ocorre a dissolução do β-TCP, explicando a alta concentração de cálcio. O íon estrôncio, por estar presente na superfície das microesferas é também liberado pelo processo de difusão e dissolução. Já no pH 7,4, a liberação de Sr é maior que a de Ca. Como o meio favorece o processo de inchamento devido as carboxilas do alginato encontrarem-se ionizadas, as ligações coordenadas se rompem e o íon Sr^{2+} ligado a elas é facilmente liberado. Assim, a diferença de concentração da solução reticulante não parece modificar o mecanismo de dissolução e liberação de estrôncio das microesferas em ambos os pHs como discutido anteriormente.

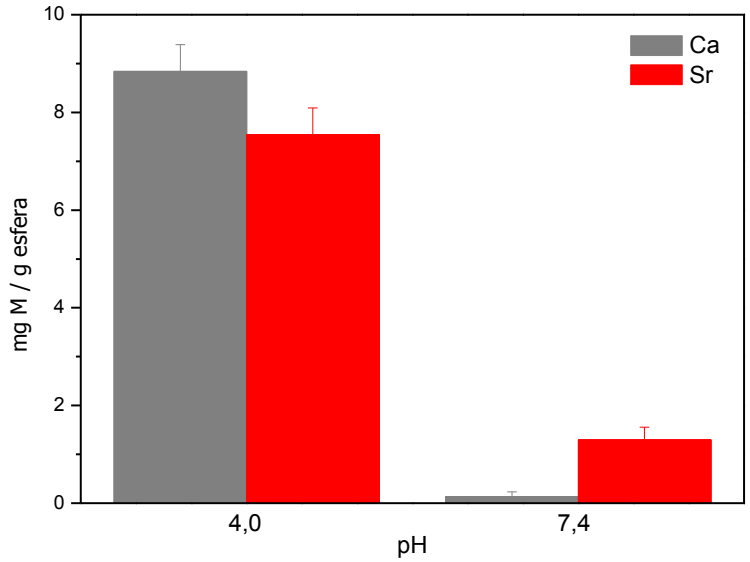


Figura 40: Liberação de cálcio e estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de $SrCl_2$ (1,5 mol.L^{-1}) após 24h de imersão. M = Ca ou Sr.

Nos testes *in vitro* realizados com as microesferas produzidas empregando solução concentrada de $SrCl_2$, há uma liberação de Sr de 89% e 51% em pH 4,0 e 7,4, respectivamente. Comparando-se estes valores com a porcentagem de liberação das microesferas produzidas empregando solução menos concentrada (Tabela 8), a porcentagem de liberação de Sr das microesferas produzidas empregando solução mais concentrada são superiores, indicando que o íon estrôncio, neste caso, pode estar mais fracamente ligado às carboxilas do alginato. O processo de gelificação em solução mais concentrada do agente reticulante é mais rápido, de modo que as ligações cruzadas formam-se rapidamente, o que explicaria a maior liberação.

Tabela 8: Porcentagem de estrôncio presente nas microesferas produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio e porcentagem de liberação do íon estrôncio durante os testes *in vitro*.

Microesferas produzidas	**% Sr incorporada**	**% Sr liberada pH 4,0**	**% Sr liberada pH 7,4**
$SrCl_2$ (0,15 mol.L^{-1})	1,18 ± 0,050	48	14
$SrCl_2$ (1,50 mol.L^{-1})	0,85 ± 0,0035	89	51

PARTE 3 – MICROESFERAS DE ALGINATO/β-TCP/Sr EMPREGANDO O FÁRMACO RANELATO DE ESTRÔNCIO

5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS MICROESFERAS DE ALGINATO/β-TCP/Sr

5.4.1 Microesferas produzidas pela incorporação do íon estrôncio empregando uma mistura (1:1) de solução de cloreto de cálcio (0,15 mol.L^{-1}) e menor concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v)

Um estudo sobre a reprodutibilidade do método empregado para a produção das microesferas foi realizado. O procedimento foi realizado em triplicata e as microesferas de ALG/β-TCP/Sr foram produzidas com 96 % de rendimento.

O método empregado produz esferas de diferentes tamanhos (Figura 41). A faixa granulométrica obtida em maior fração é a de 500-600 μm e somente 13 % das microesferas produzidas encontram-se na faixa de trabalho desejada (355-420 μm).

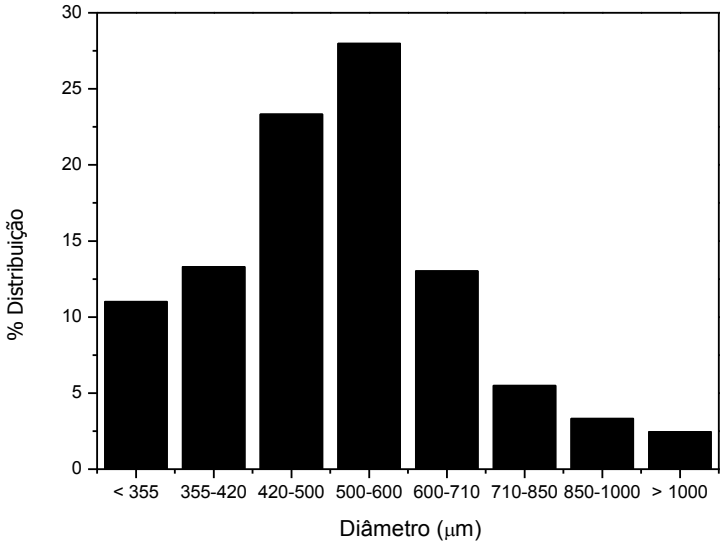
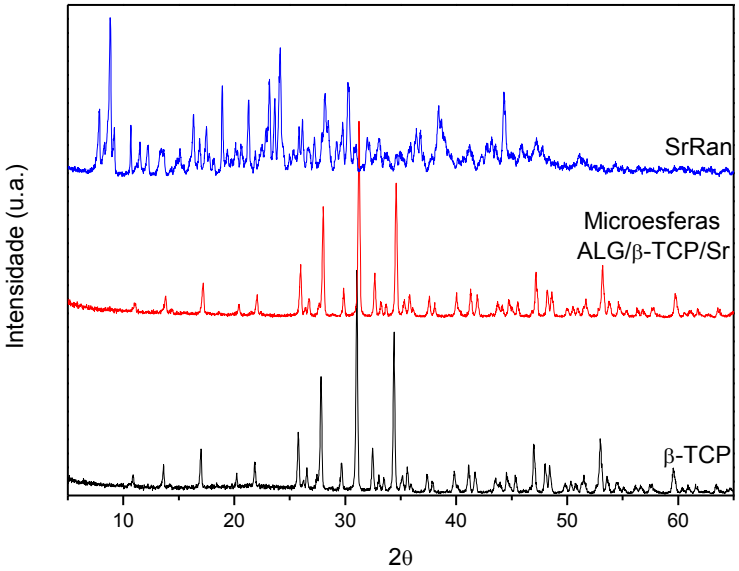


Figura 41: Distribuição de tamanho das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando uma mistura (1:1) de solução de cloreto de cálcio (0,15 mol.L^{-1}) e menor concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v).

O difratograma das microesferas produzidas está ilustrado na Figura 42a. É possível observar que as reflexões de Bragg para as microesferas estão ligeiramente deslocadas para valores de 2θ maiores em relação às reflexões do fosfato tricálcico (Figura 42b). Isso se deve à contração da matriz polimérica por meio da ligação química entre o alginato e o β-TCP, similarmente ao verificado para as microesferas produzidas empregando solução de $SrCl_2$.



(a)

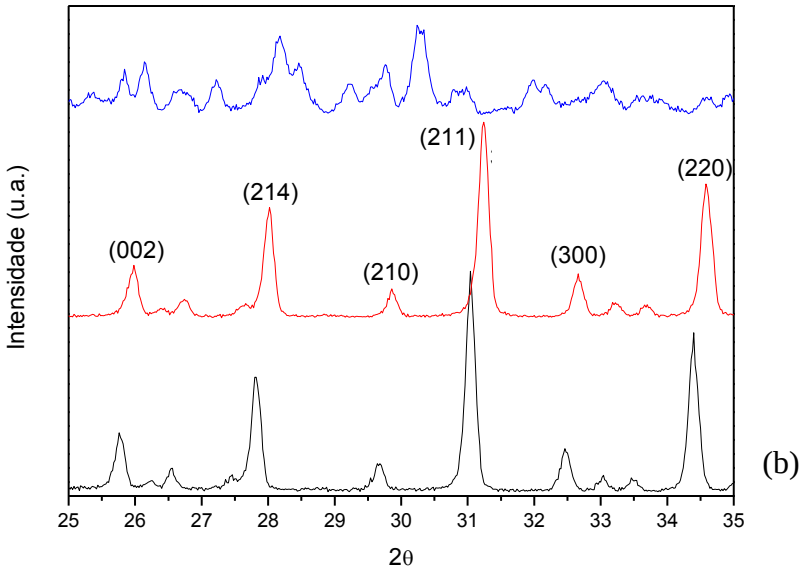


Figura 42: (a) DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v) e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º).

Nesse método de produção das microesferas em que a fonte de estrôncio é proveniente do fármaco Ranelato de Estrôncio, é de se esperar que pequena quantidade de estrôncio esteja disponível para o processo de gelificação, uma vez que o ranelato é uma molécula volumosa e pouco solúvel em água. Assim, provavelmente, o cálcio presente no meio seria o agente de reticulação e não o SrRan e o estrôncio seria incorporado por meio de um processo de adsorção física na superfície das microesferas. Porém, nenhum dos principais picos de difração do SrRan (faixa de 2θ 7 a 15º) foram encontrados no difratograma das microesferas produzidas.

O difratograma das microesferas de ALG/β-TCP/Sr foi analisado pelo software Match! (dado não mostrado) e nenhuma fase secundária foi encontrada. A única fase presente é o β-TCP, de acordo com o banco de dados JCPDS 9-0169 e com 92 % de grau de ajuste.

Em trabalhos de adsorção de fármacos em fosfatos de cálcio, principalmente em HA, β-TCP e DCPA, os autores observam alterações no perfil de DRX em que os picos tornam-se menos intensos e mais alargados, mas não há variação na posição das reflexões de Bragg.

O espectro de infravermelho das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas pode ser observado na Figura 43. Comparando-se o espectro das microesferas com o do alginato, há um pequeno deslocamento na posição (1603 e 1414 cm^{-1}) e uma considerável diminuição da intensidade das bandas dos grupos C=O e COO^-. Esses efeitos podem estar relacionados com a interação eletrostática entre os íons cálcio do β-TCP e os oxigênios da carboxila do alginato (XIE *et al.*, 2010). Não foram observadas as bandas principais do ranelato de estrôncio (3246 e 2203 cm^{-1}) nas microesferas produzidas.

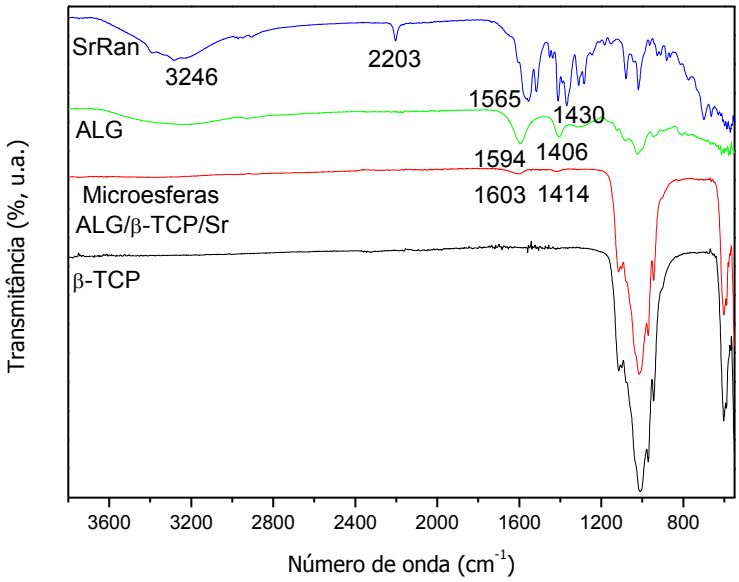


Figura 43: Espectro de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v).

A Figura 44a exibe a morfologia das microesferas de ALG/β-TCP/Sr. As microcápsulas apresentam superfície bem rugosa, com reentrâncias e o β-TCP embebido na matriz porosa do alginato (Figura 44b). Não se observam trincas nas microesferas produzidas, mesmo elas apresentando uma superfície irregular e rugosa.

A análise por EDS confirmou a presença do íon estrôncio na superfície das microesferas produzidas (Figura 44c). Como o íon Sr foi identificado nas microcápsulas, pode-se concluir que o método empregado para a incorporação desse íon foi eficaz.

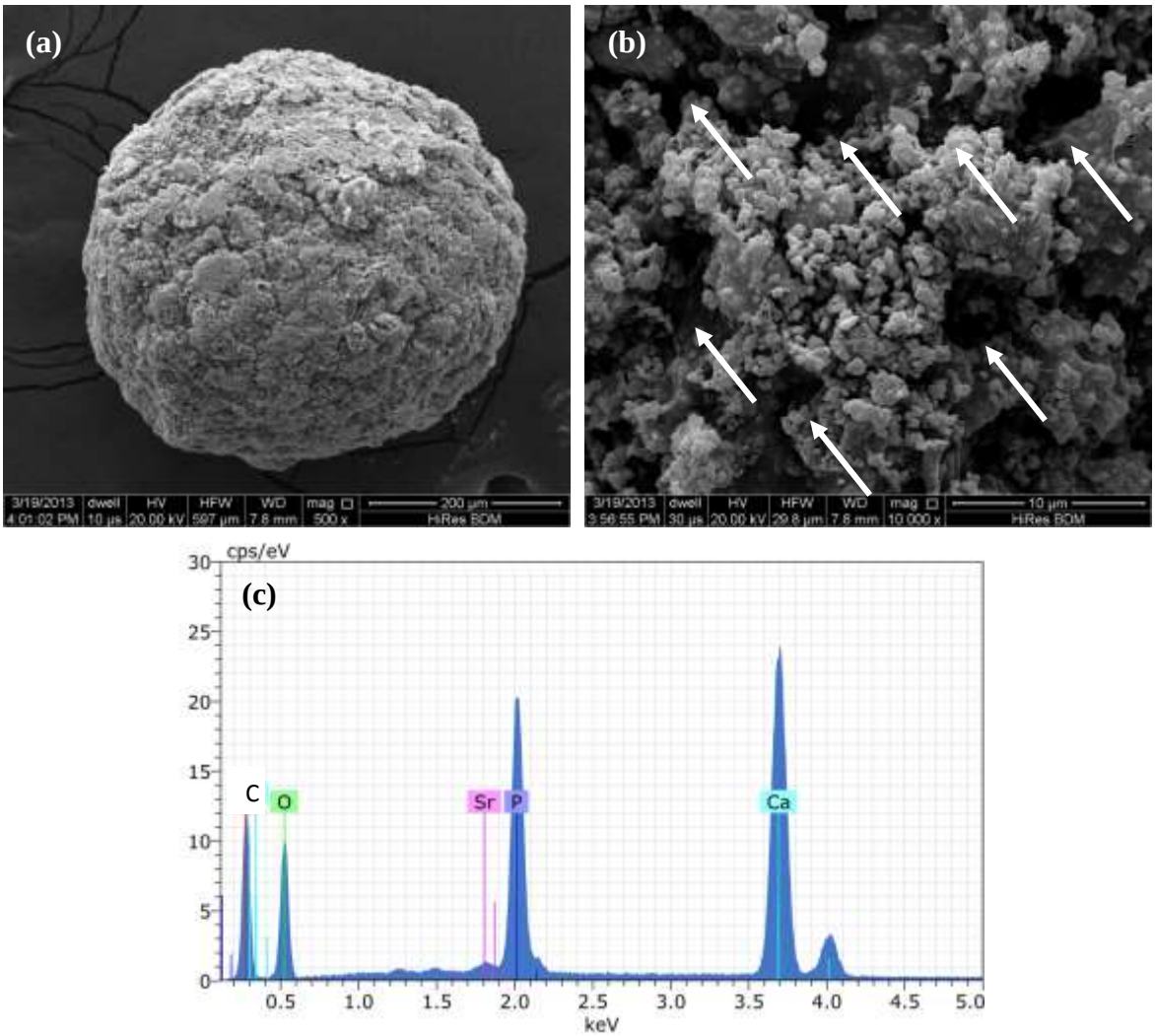


Figura 44: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v): (a) Aumento de 200x, (b) Aumento de 5.000x, mostrando em detalhe a presença de poros na escala de 1 a 1,5 µm e (c) Espectro de EDS.

Contudo, a análise de EDS da seção transversal das microesferas (Figura 45) não identificou a presença do íon Sr no interior das microcápsulas. Isso demonstra que o íon estrôncio se encontra distribuído na superfície externa das microesferas, similarmente ao observado para as outras microesferas produzidas, onde foi usado cloreto de estrôncio como agente reticulante.

Nesse método de produção das microesferas em que a fonte de estrôncio é proveniente do fármaco Ranelato de Estrôncio, possivelmente o íon estrôncio foi incorporado por meio de um processo de adsorção física nas microesferas, preferencialmente, ele seria encontrado

preferencialmente na superfície. Sendo um processo de adsorção, dificilmente o íon estrôncio se difundiria para o interior das microesferas.

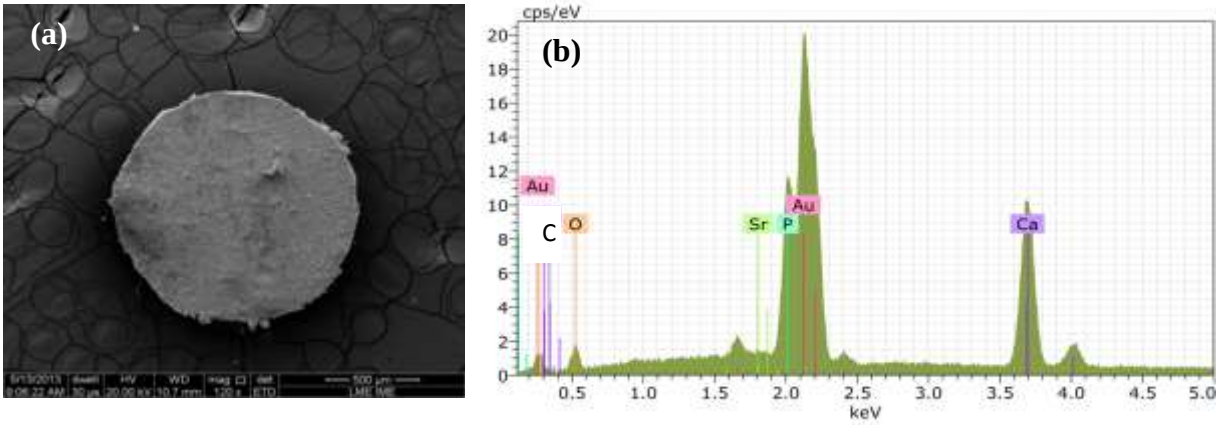


Figura 45: (a) Micrografia da seção transversal das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v) e (b) Espectro de EDS da seção transversal.

A curva de TG/DTG das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas está apresentada na Figura 46. É possível identificar três regiões de perda de massa: a primeira perda ocorre na faixa de 30-200 ºC, a segunda na faixa de 200-600 ºC e a terceira na faixa de 600-800 ºC. A primeira etapa de perda de massa corresponde à saída de água presente nas microesferas (1,3 %). A segunda etapa se deve à decomposição do alginato (3,3 %) e se caracteriza por uma perda "longa" até a degradação completa do polímero. A última etapa de perda de massa está associada à mudança de fase de alguma fração de apatita não estequiométrica para β-TCP (1,0 %) (IGNJATOVIĆ *et al*., 2007; SON *et al*., 2012; TAMPIERI *et al*., 2005). A perda de massa total das microesferas é de 5,6 % e o resíduo resultante corresponde a 94,4 %. A análise do termograma para as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas mostrou que elas são termicamente estáveis até a temperatura de 800 ºC, sendo praticamente eliminado somente o alginato.

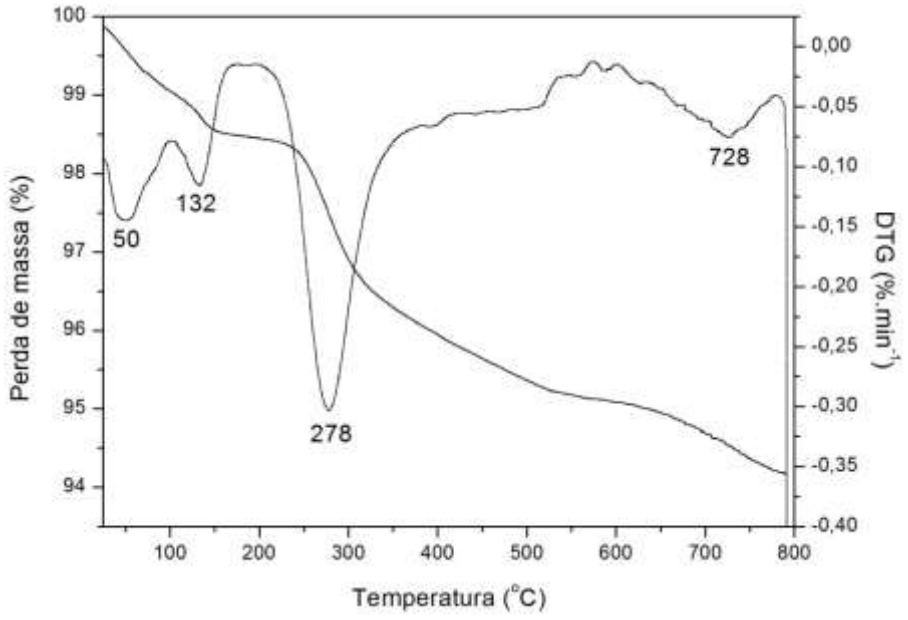


Figura 46: Curva de TG das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v).

5.4.2 Microesferas produzidas pela incorporação do íon estrôncio empregando uma mistura (1:1) de solução de cloreto de cálcio (0,15 mol.L^{-1}) e maior concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (38,5% p/v)

Esse item corresponde aos resultados de caracterização das microesferas de ALG/β-TCP/Sr obtidas empregando-se uma mistura (1:1) do fármaco Ranelato de Estrôncio (SrRan) dez vezes mais concentrada que a utilizada anteriormente e uma solução de $CaCl_2$ (0,15 mol.L^{-1}).

A produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando uma solução mais concentrada do fármaco SrRan (38,5% p/v) foi obtida com 88% de rendimento. A distribuição dos diâmetros das esferas produzidas é ilustrada na Figura 47, sendo que somente 7 % das microesferas se encontram na faixa granulométrica de interesse.

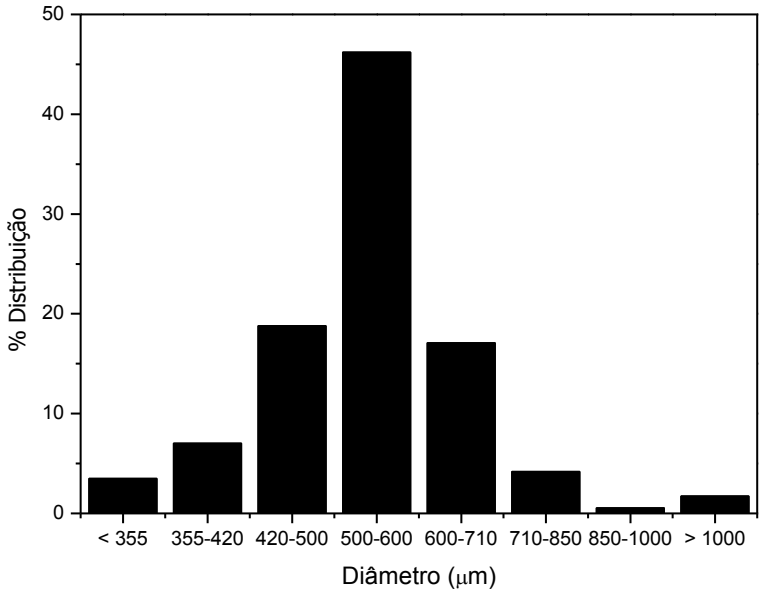
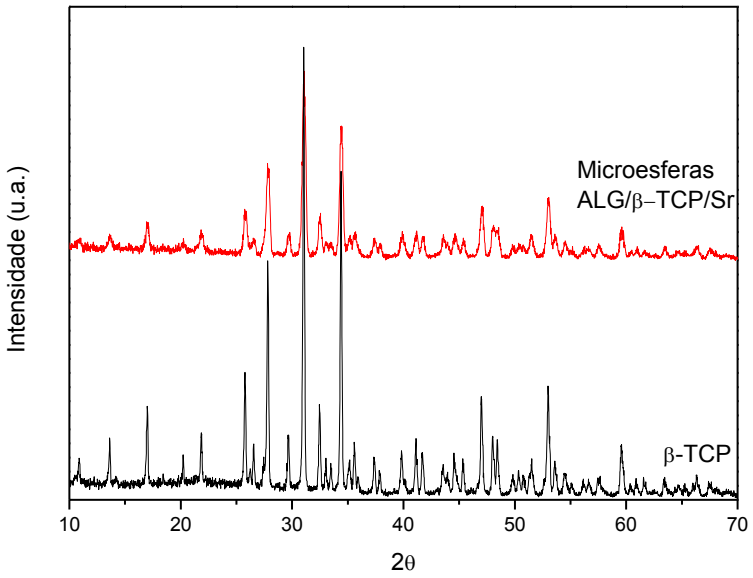


Figura 47: Distribuição de tamanho das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando uma mistura (1:1) de solução de cloreto de cálcio (0,15 mol.L^{-1}) e maior concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (38,5% p/v).

O difratograma das microesferas produzidas está apresentado na Figura 48a. É possível observar que houve uma diminuição considerável da intensidade e um alargamento dos picos de difração para as microesferas produzidas. Porém, não foi verificado nenhum deslocamento das reflexões de Bragg em relação às reflexões do β-TCP (Figura 48b).



(a)

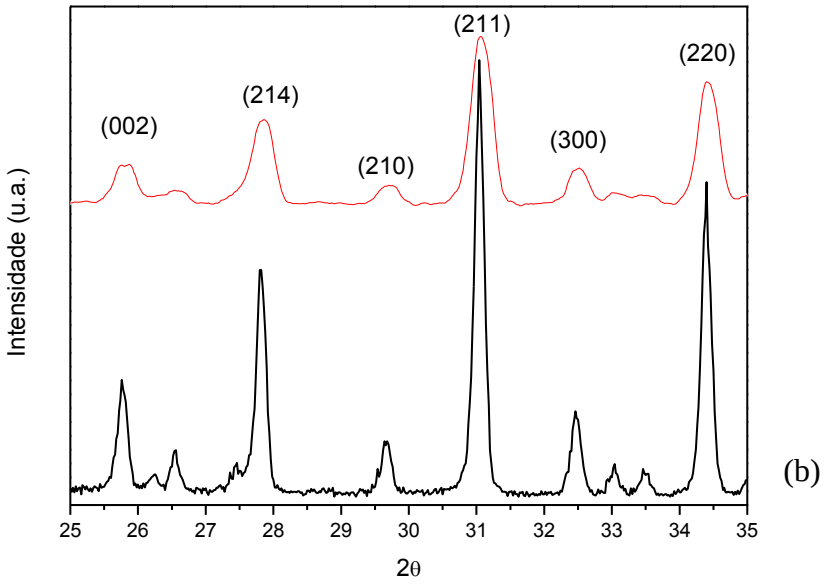


Figura 48: DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (38,5% p/v) em maior concentração e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º).

O difratograma das microesferas de ALG/β-TCP/Sr foi analisado pelo software Match! (dado não mostrado). A largura dos picos dificulta o ajuste pelo software (Rp > 25), mas ainda assim, o programa encontrou como única fase, o β-TCP, de acordo com o banco de dados JCPDS 9-0169 com 90% de grau de ajuste.

O espectro de infravermelho das microesferas ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando maior concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (não mostrado), não apresentou nenhuma diferença significativa em termos de posição e intensidade das bandas características do alginato e do fosfato já discutido anteriormente.

A morfologia das microesferas de ALG/β-TCP/Sr pode ser observada na Figura 49a. As microcápsulas apresentam superfícies menos rugosas e mais homogêneas que as anteriores. Observa-se que as partículas esféricas do β-TCP se encontram bem embebidas e homogeneamente dispersas à matriz porosa do alginato (Figura 49b).

A presença do íon estrôncio nas microesferas produzidas foi confirmada por EDS (Figura 49c). Porém, através dessa técnica, não se pode concluir se houve maior ou menor

inserção de Sr às microesferas. A análise química das microesferas será determinante para inferir se o emprego de uma solução mais concentrada implica numa maior incorporação de estrôncio.

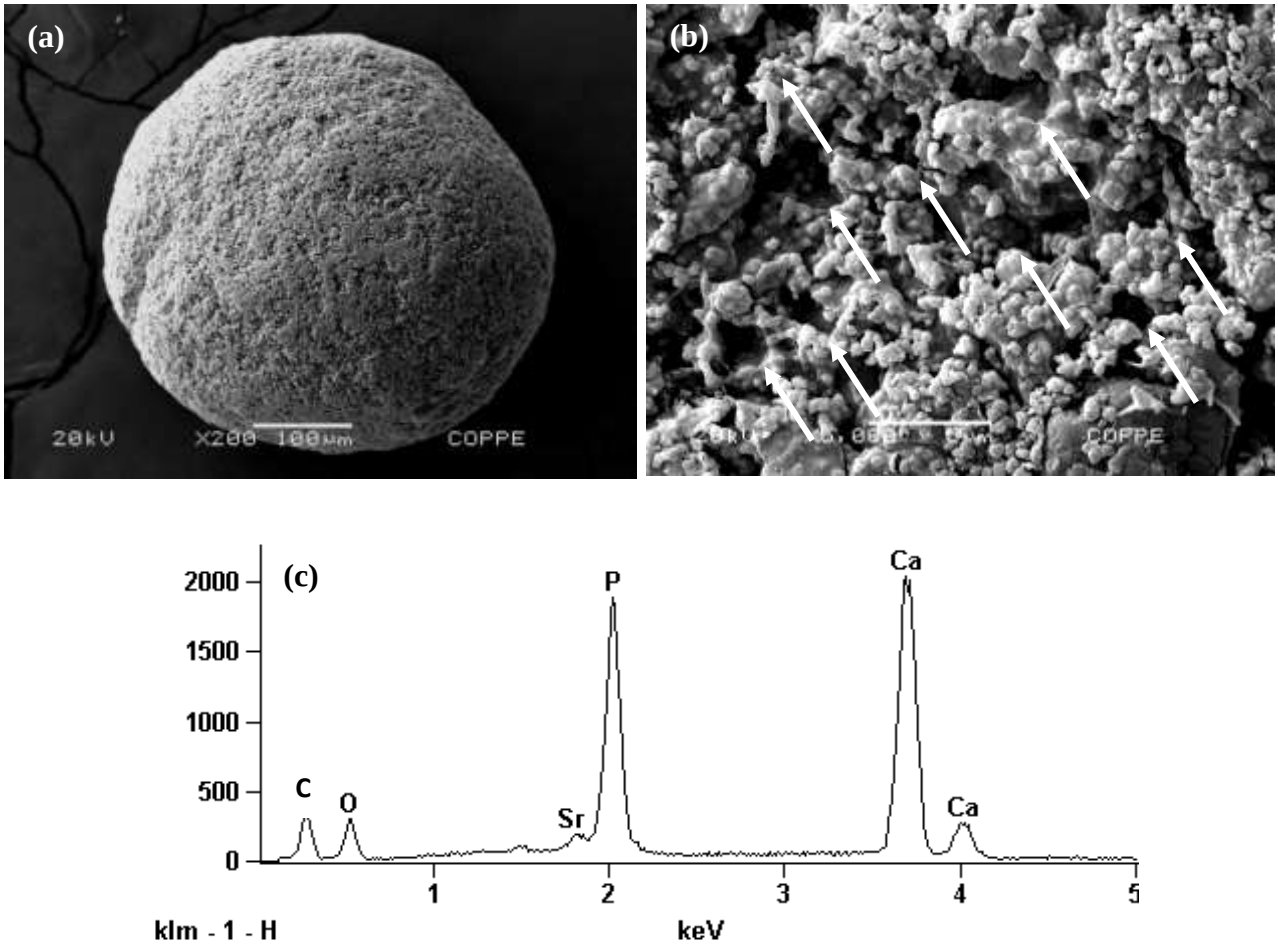


Figura 49: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (38,5% p/v) em maior concentração. (a) Aumento de 200x, (b) Aumento de 5.000x, mostrando em detalhe a presença de poros na escala de 1 a 1,5 µm e (c) Espectro de EDS.

5.4.3 Análise química das microesferas produzidas através da incorporação do íon estrôncio empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio

Para a quantificação do íon estrôncio presente nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio foram também empregados dois processos, o método direto e indireto, como descrito no item 4.4.1. Os ensaios foram

realizados em triplicata e a média dos valores encontrados em ambos os processos está apresentada na Tabela 9 (método direto) e 10 (método indireto).

Tabela 9: Concentração de Ca e Sr obtida pelo método direto a partir das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio.

Microesferas produzidas	Concentração Ca (%)	Concentração Sr (%)
SrRan (3,85% p/v)	28,49 ± 0,73	0,37 ± 0,020
SrRan (38,5% p/v)	41,45 ± 0,41	0,60 ± 0,0082

A Tabela 9 mostra que a quantidade de estrôncio incorporada empregando a solução concentrada foi maior. Essa observação contribui com a hipótese de que a maior parte do íon estrôncio é inserida nas microesferas pelo processo de adsorção. Considerando que esse mecanismo acontece, uma maior concentração do adsorvato (componente a ser adsorvido, SrRan) promove uma maior acumulação no adsorvente (substrato; componente em que ocorre a adsorção em sua superfície, microesferas). Por esse motivo, a maior concentração de Sr encontra-se presente nas microesferas produzidas com maior quantidade do fármaco Ranelato de Estrôncio. CALDAS (2012) comprovou a adsorção do fármaco SrRan em microesferas de alginato/hidroxiapatita por estudos de EAA, além de verificar uma maior adsorção do ranelato de estrôncio quando se emprega uma solução que corresponde a 34,1 % de Sr.

A maior concentração de estrôncio contida nas microesferas (0,6%) equivale a uma concentração de estrôncio igual a 0,07 $mmol.L^{-1}$. Este valor equivale à metade do encontrado considerando a concentração de estrôncio contida nas microesferas produzidas empregando solução de $SrCl_2$ (0,14 $mmol.L^{-1}$ de Sr). Isso indica que o processo de gelificação é capaz de incorporar mais estrôncio que o processo de adsorção.

Tabela 10: Concentração de Ca e Sr obtida pelo método indireto a partir das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio.

Microesferas produzidas	Concentração Ca ($mg.L^{-1}$)	Concentração Sr ($mg.L^{-1}$)
Solução $CaCl_2$ (teórica)	$6{,}0.10^3$	-
Solução $CaCl_2$ (experimental)	$5{,}9.10^3$	-
Suspensão SrRan (teórica)	-	$13{,}15.10^3$
Suspensão SrRan (experimental)	-	$2{,}47.10^3 \pm 135{,}0$
Solução Pós-Produção	$1{,}76.10^3 \pm 13{,}07$	$1{,}74.10^3 \pm 59{,}40$
Água de Lavagem	$22{,}5 \pm 6{,}03$	$150{,}9 \pm 28{,}71$

De acordo com os resultados da Tabela 10, observa-se que a concentração de cálcio experimental para a solução original de $CaCl_2$ está bem próxima do valor teórico. No caso da concentração de estrôncio para o ranelato de estrôncio (valor experimental), o desvio é bem grande, pois o pó de ranelato é pouco solúvel em água, tornando difícil sua medição. Devido a este fato, a quantificação de Sr pelo método indireto não foi possível, pois a concentração medida é muito inferior ao valor teórico, indicando erro na análise.

As microesferas de ALG/β-TCP/Sr obtidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio foram analisadas por UV-Vis (Figura 50) a fim de identificar a presença da molécula de ranelato de estrôncio nas microcápsulas produzidas e quantificar o íon estrôncio. Através da curva analítica para o SrRan (Figura 14, item 4.4.2), obteve-se 8,85% de Sr presente nas microesferas obtidas empregando menor concentração de SrRan (3,85% p/v). Porém, essa quantidade é muito superior ao valor encontrado para a concentração de Sr por EAA (0,37%). Talvez, o valor para a concentração de Sr obtida por EAA esteja inferior ao valor real devido à forte influência do efeito de matriz.

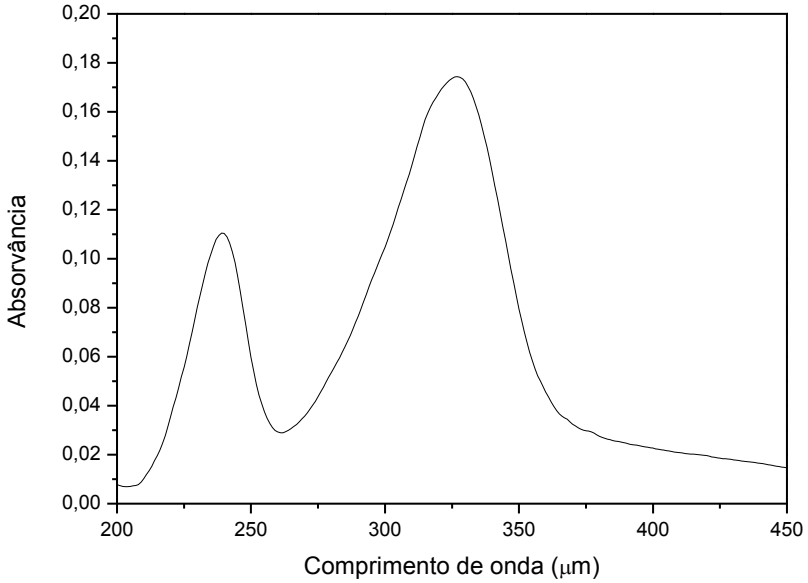


Figura 50: Espectro de UV-Vis do Ranelato de Estrôncio presente nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr obtidas empregando o fármaco SrRan (3,85%).

As leituras de concentração de um determinado elemento por EAA podem sofrer, dentre outros tipos, interferências de matriz, que geralmente, refletem em uma diminuição da concentração real. Elas ocorrem devido a características físico-químicas da matriz, como viscosidade, tensão superficial e presença de compostos orgânicos que se diferenciam dos padrões (geralmente preparados somente em meio aquoso). Quando há esse tipo de interferência é recomendável simular a matriz da amostra, de modo que os padrões e as amostras sejam compostos de uma mesma matriz e entende-se que qualquer interferência que afete as amostras, de modo semelhante afetará os padrões (JUNIOR, BIDART, CASSELA, 20; TODOLÍ e MERMET, 1999).

No caso das microesferas de ALG/β-TCP/Sr obtidas empregando o fármaco SrRan, além da matriz orgânica do alginato, ainda está presente a matriz do ácido ranélico. Mesmo após a abertura das amostras, essas matrizes ainda se encontram presentes, gerando uma interferência na análise e, consequentemente, valores de concentração de estrôncio menores.

A diferença de valores encontrados para a concentração de estrôncio incorporada considerando a técnica de UV-Vis e a EAA pode ser explicada também levando-se em

consideração a presença do íon Ran^{-4}. O UV-Vis faz a leitura da molécula orgânica, o ácido ranélico, que por estequiometria, chega-se ao estrôncio (1 mol ácido ranélico equivalem a dois mols de estrôncio). Assim, como em solução é o íon Ran^{-4} que está presente, parte dele poderia estar adsorvida na superfície das microesferas na forma de Ran^{4-}. Esse ânion se ligaria aos sítios positivos encontrados na superfície das microesferas, refletindo o valor superestimado da concentração de estrôncio.

5.5 TESTES *IN VITRO* DE DISSOLUÇÃO E LIBERAÇÃO DE ESTRÔNCIO

As microesferas de ALG/β-TCP/Sr obtidas empregando menor concentração do fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85%) foram submetidas aos testes *in vitro* de dissolução e liberação de estrôncio segundo a descrição no item 4.5. Os dados experimentais apresentados equivalem a uma média dos três valores obtidos pelos ensaios realizados em triplicata.

Ao final de todos os tempos de estudo, após as microesferas ficarem em contato com a solução tampão, a solução apresentava aspecto leitoso. Visualmente, os tubos dos testes de pH 7,4 estavam mais turvos quando comparados com os tubos dos ensaios em pH 4,0, indicando que houve uma maior dissolução das microesferas de ALG/β-TCP/Sr nesse meio.

A concentração acumulada de cálcio e estrôncio liberada após cada intervalo de tempo pode ser vista na Figura 51. Os testes *in vitro* mostraram que, em ambos os valores de pH testados, há um aumento da concentração de cálcio e estrôncio na solução, indicando uma rápida liberação desses íons nos tempos observados. O íon estrôncio atinge o máximo de liberação em 12h, enquanto que o cálcio, após 24h de imersão. Depois do *burst* inicial, há uma diminuição das concentrações desses íons no meio, voltando a subir ligeiramente até que a liberação cesse. A diminuição das concentrações de estrôncio e cálcio após 24h é devido ao processo de precipitação de uma nova fase (DOROZHKIN, 2002).

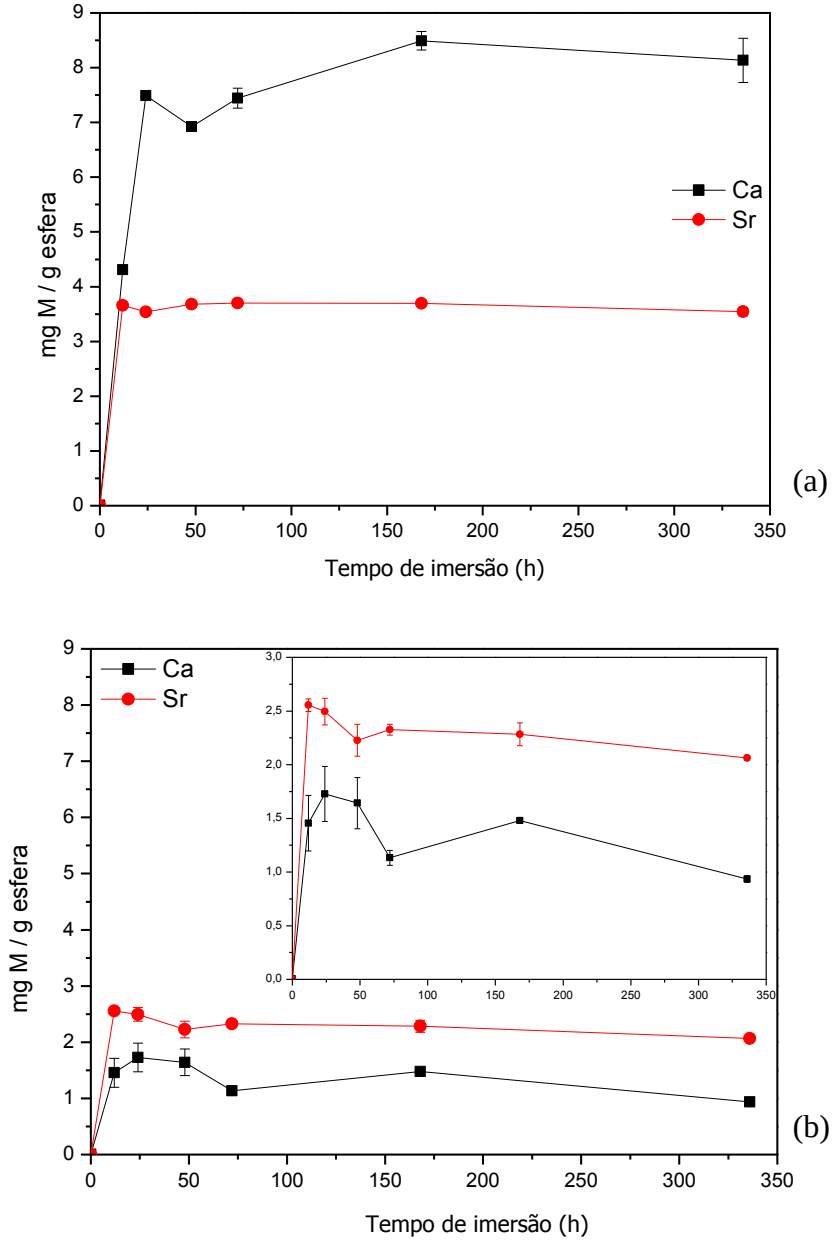


Figura 51: Perfil de liberação acumulativa de cálcio e estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%) em função do tempo de imersão: (a) pH 4,0 e (b) pH 7,4 e detalhe em menor escala do perfil de liberação de Ca e Sr. M = Ca ou Sr.

Os perfis de liberação de cálcio e estrôncio em ambos pHs exibem uma tendência similar. Observa-se que a liberação dos íons Ca^{2+} e Sr^{2+} é maior em pH 4,0 devido a esse pH

promover a dissolução dos fosfatos de cálcio. Como a concentração de cálcio é bem maior que a de estrôncio nas microesferas, a concentração liberada desse íon também será elevada quando comparada com a de estrôncio (Figura 51a).

Após a liberação máxima dos íons em pH 4,0, a razão molar Sr/Ca permanece constante e igual a 0,5 durante todo o experimento, indicando que a taxa de liberação de Ca é praticamente o dobro de Sr. Isso significa que esse pH parece influenciar mais na liberação do cálcio e que em 12 horas quase todo o estrôncio presente nas microesferas foi liberado. O fato da liberação de Sr^{2+} ter sido mais rápida para as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando SrRan corrobora com a hipótese de que o íon estrôncio proveniente do fármaco não está ligado quimicamente às microesferas e sim, fisicamente pelo mecanismo de adsorção física.

Em pH 7,4 (Figura 51b), há uma maior liberação de estrôncio quando comparada com a liberação de cálcio. Esse resultado corrobora com o fato de que os íons Sr^{2+} estão adsorvidos na superfície das microesferas, tendo sua liberação favorecida pelo processo de difusão. Além disso, nesse pH, as carboxilas do ácido ranélico tendem a ficar na forma ionizada favorecendo a liberação do íon estrôncio (pKa's do ácido ranélico – ver Apêndice).

No mecanismo de dissolução das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan ocorrerem as seguintes etapas, independente do pH da solução tampão: quando as microesferas são colocadas em contato com a solução tampão, inicia-se o processo de difusão e troca iônica de cálcio e estrôncio para o meio. Ao mesmo tempo, ocorre parcialmente a dissolução do β-TCP com a liberação de íons fosfato. A presença de íons Ca^{2+}, Sr^{2+} e PO_4^{3-} no meio propicia a precipitação de uma nova fase, diminuindo a concentração desses íons em solução. Com o aumento do tempo de imersão, maior também é o inchamento das microesferas deixando a cadeia polimérica cada vez mais relaxada. Quando o processo de intumescimento atinge o máximo, ocorre o colapso da matriz devido à perda da estrutura "*egg-box*" causada pelo rompimento das ligações coordenadas do alginato com o íon Sr^{2+}.

Dependendo do pH da solução tampão, a taxa de dissolução das microesferas e liberação do íon estrôncio pode ser maior devido à dissolução do β-TCP em pH ácido ou devido a eleva taxa de difusão em pH neutro.

Sendo assim, o comportamento de dissolução e liberação de estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio segue um perfil de liberação que é governado pelo processo de difusão, caracterizado pelo modelo proposto por Higuchi, onde se tem um máximo de liberação em 12 horas (DASH *et al.*, 2010). Essa liberação máxima do íon estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr corresponde a 99% para o pH 4,0 e 69% para o pH 7,4 do total do Sr presente nas microesferas. Esses resultados mais uma vez refletem que pelo fato dos íons estrôncio estarem adsorvidos na superfície das microesferas, ele é mais facilmente liberado.

A variação de pH durante os testes *in vitro* é mostrada na Figura 52. Ao longo do experimento observa-se que houve alteração no pH da solução tampão e essa diferença é maior no ensaio a pH 4,0. Essa mudança de pH pode ser explicada pela dissociação do β-TCP e formação das espécies HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$, segundo as equações 2.1 a 2.4. Com a dissolução do β-TCP em meio ácido, ocorre uma liberação de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} e um consumo de íons H^+ do meio, por isso, o pH aumenta. Em seguida, com a formação da espécie H_3PO_4 em solução, o pH volta a cair. Quando o equilíbrio é atingido, o pH da solução fica constante (ZOU *et al.*, 2011).

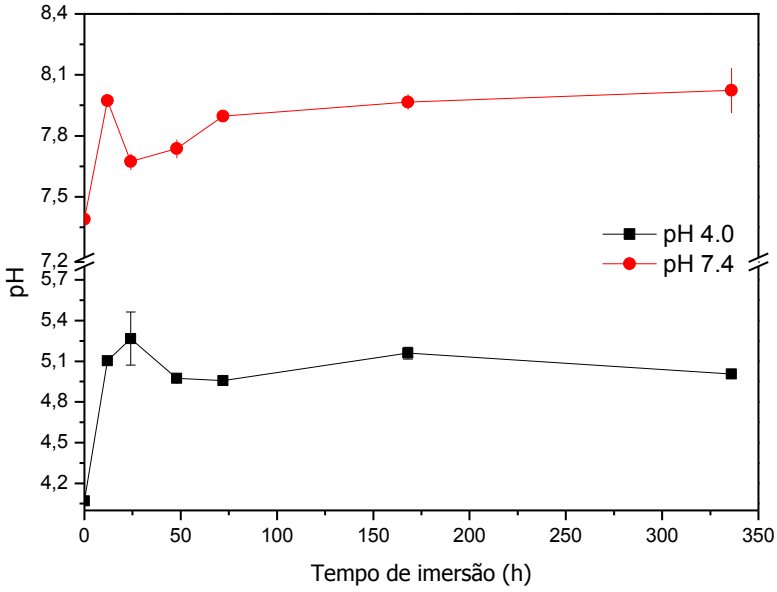


Figura 52: Variação de pH durante os testes *in vitro* das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%).

As Figura 53 apresenta o DRX das microesferas de ALG/β-TCP/Sr resultantes dos testes *in vitro* em pH 4,0. Os difratogramas das amostras nos diferentes tempos de imersão mostraram, entre si, os mesmos perfis de difração. Porém, com relação às microesferas no tempo zero, eles apresentaram um deslocamento para valores de 2θ menores, coincidindo com a posição das reflexões de Bragg para o β-TCP. Além disso, houve uma diminuição de intensidade e alargamento dos picos principais, indicando uma possível precipitação de um composto pouco cristalino. O software Match! detectou com 89% de grau de ajuste que a única fase cristalina presente é o β-TCP em todas as amostras. Como não houve nenhuma observação diferente do que já foi citado para os testes realizados em pH 7,4, os difratogramas das amostras não foram apresentados.

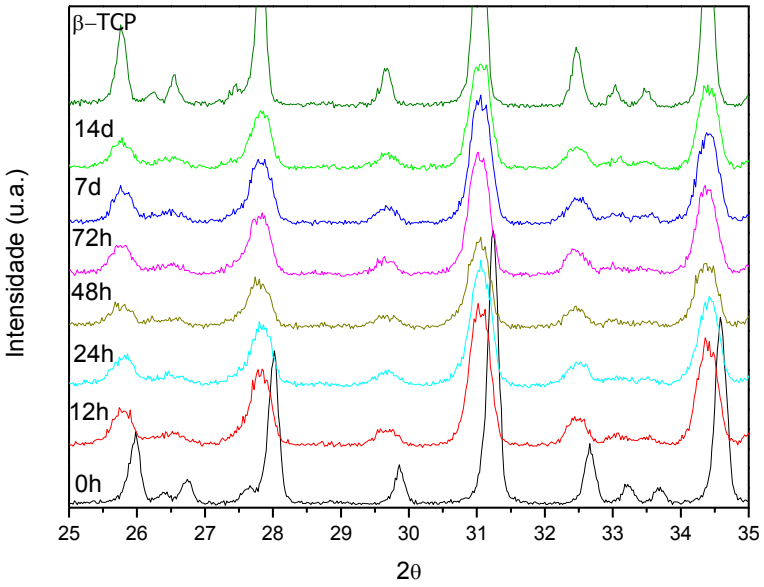


Figura 53: Difratograma de raios X das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%) após o ensaio de dissolução em pH 4,0.

Os espectros de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando o fármaco SrRan após o ensaio de dissolução em pH 4,0 e 7,4 estão apresentados na Figura 54a e 54b, respectivamente. É possível verificar em ambos os casos (pH 4,0 e 7,4) que as bandas referentes à carbonila (C=O) e carboxila (COO^-) do alginato ficaram mais largas e pouco mais

intensas. Isso provavelmente se deve ao processo de intumescimento das microesferas ao longo do tempo, tornando mais evidente essas bandas.

No ensaio realizado em pH 7,4 observa-se o aparecimento da banda em 873 cm^{-1} a partir de 72h de imersão. Essa banda é característica do grupo HPO_4^{2-}, indicando uma possível precipitação de CDHA, OCP, DCPD, a qual não foi possível confirmar por DRX. No pH 4,0, não foi possível identificar essa banda nos espectros das amostras.

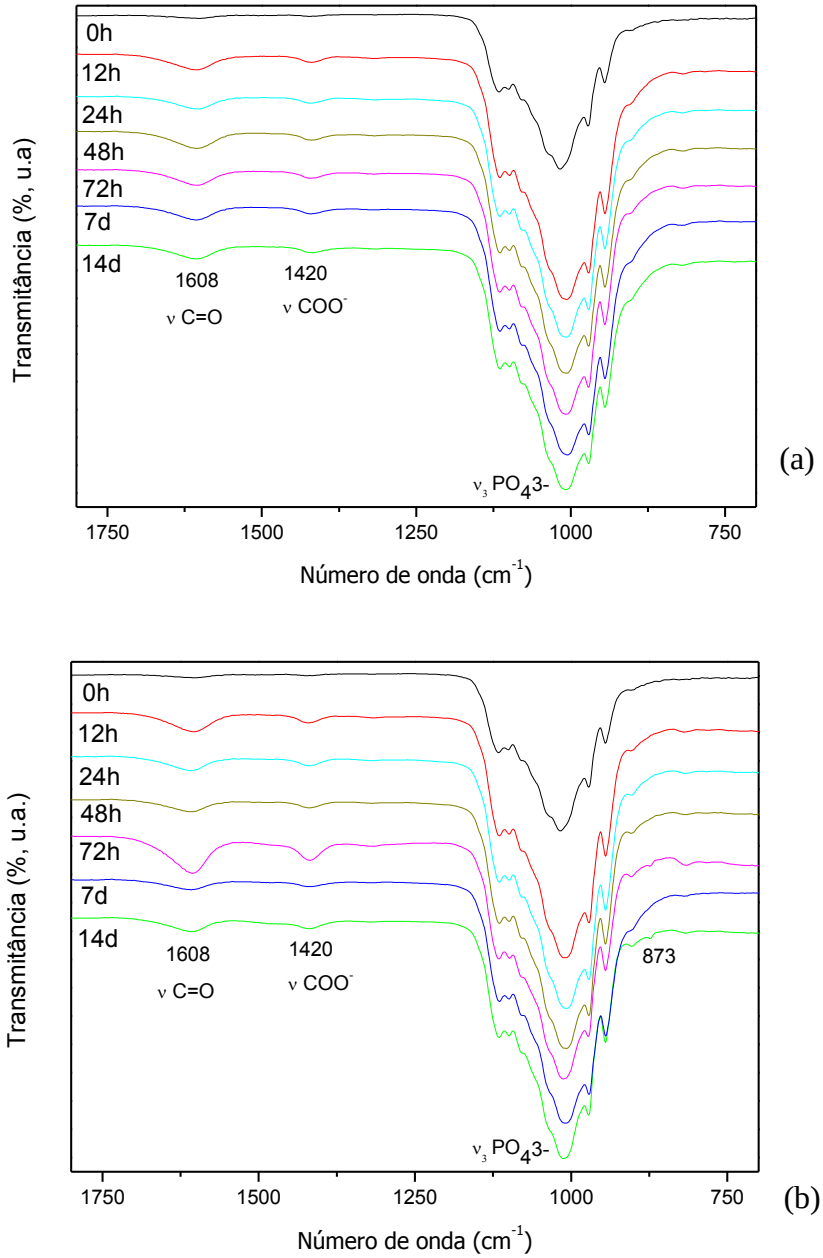


Figura 54: Espectro de FTIR das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%) após o ensaio de dissolução: (a) pH 4,0 e (b) pH 7,4.

A Figura 55 apresenta as micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr após o ensaio de dissolução em pH 4,0. Nesse pH em 24h, nota-se que as microesferas já se encontram inchadas, indicando que o processo de intumescimento para essas esferas ocorre rapidamente. Ao longo do tempo em contato com a solução tampão, elas incham ainda mais e em 7 dias, observa-se que houve um desgaste da microesfera, onde ela perdeu sua forma esférica, causado pelo processo de erosão comum nos ensaios de dissolução. Aos 14 dias, verifica-se o colapso total da matriz. É possível verificar que mesmo em pH ácido, em que os grupos carboxilatos do alginato estariam protonados, diminuindo a taxa de absorção de água e consequente, dissolução, as microesferas encontram-se bem desgastadas. Um dos fatores que explicariam este fato é que o processo de adsorção física é reversível. O contato das microesferas com o meio ácido, diminui as forças de atração do SrRan com o compósito. Sendo o SrRan liberado, as microesferas se desgastariam já que a força da ligação cruzada com o cálcio é menor que a do estrôncio (KLEINBERGER *et al.*, 2013). Além disso, em pH 4,0, a espécie predominante do ácido ranélico é o íon $HRan^{-3}$. Assim, a tendência é formar cada vez mais esse íon no meio, favorecendo o desgaste das microesferas.

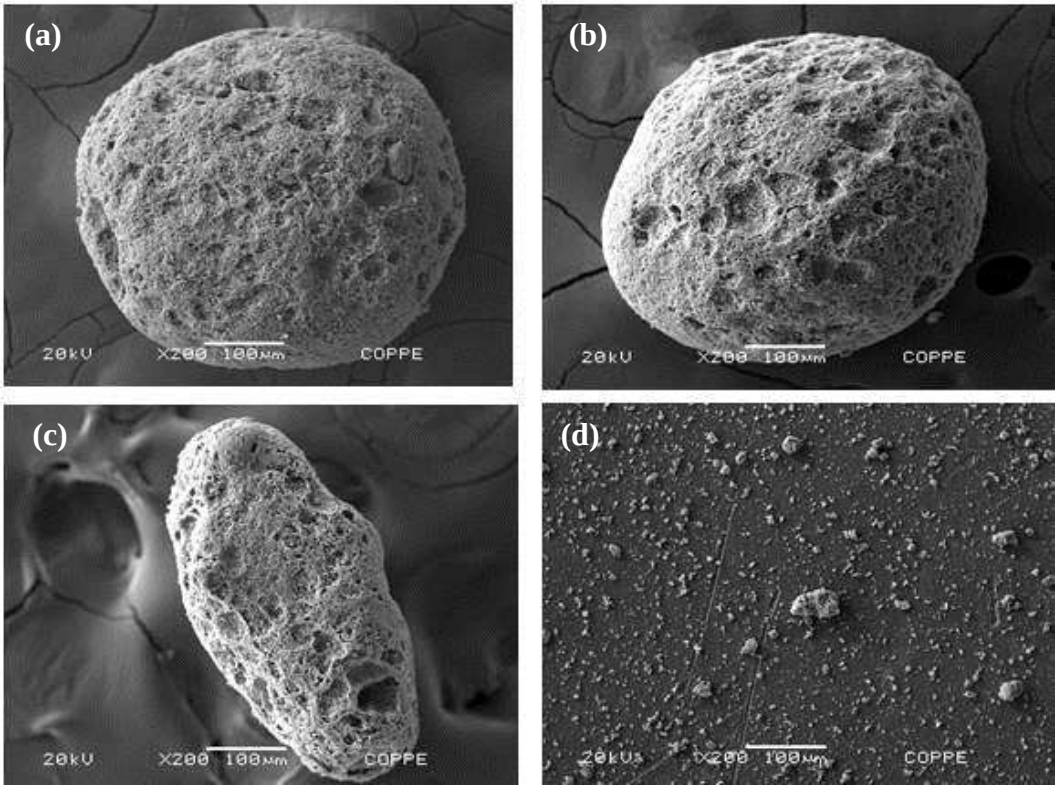


Figura 55: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%) após teste *in vitro* em pH 4,0 com diferentes tempos de imersão, aumento de 200x: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 7 dias e (d) 14 dias.

Analisando as imagens em maior aumento (Figura 56), nota-se a exposição da matriz polimérica do alginato mais evidente depois de 48h. Após 14 dias de imersão, a matriz polimérica se encontra bem mais visível. Isso ocorre devido ao meio ácido promover a dissolução do β-TCP. Estes resultados corroboram com os dados apresentados nos testes de dissolução *in vitro*, onde se observou uma maior liberação de íons Ca^{2+} e Sr^{2+} para o meio. Além disso, observa-se o aparecimento de uma fase secundária em forma de placas, compatíveis com a morfologia das fases brushita (DCPD) e fosfato octacálcico (OCP) (KAILI LIN, CHENGTIE WU, JIANG CHANG (2014); TOSHIMA *et al*., 2014).

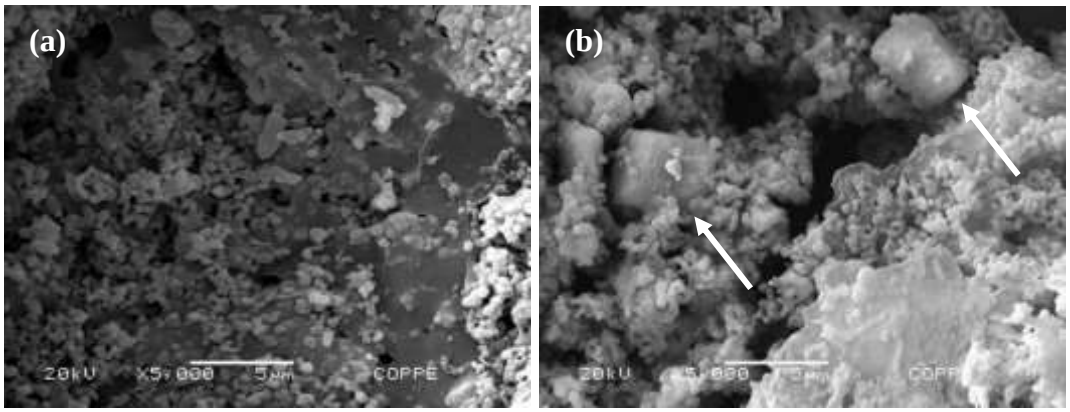


Figura 56: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando o fármaco SrRan (3,85%) após teste *in vitro* em pH 4,0 com aumento de 5.000x: (a) 48 h e (b) 14 dias. Detalhe para o aparecimento de placas.

A morfologia das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan (3,85%) após o ensaio de dissolução em pH 7,4 pode ser vista na Figura 57. Nesse pH em 48h, pode-se perceber que a microesfera já se encontra desgastada devido ao rápido intumescimento, dando início ao processo de erosão da matriz polimérica onde ocorre o rompimento das ligações coordenadas dos grupos carboxilatos com os íons Ca^{2+}. Esse processo continua até a ruptura da estrutura "*egg-box*" e em 14 dias, ocorre o colapso da matriz polimérica como também observado por BAJPAI e SHARMA (2004) e BAJPAI, SAXENA e SHARMA (2006).

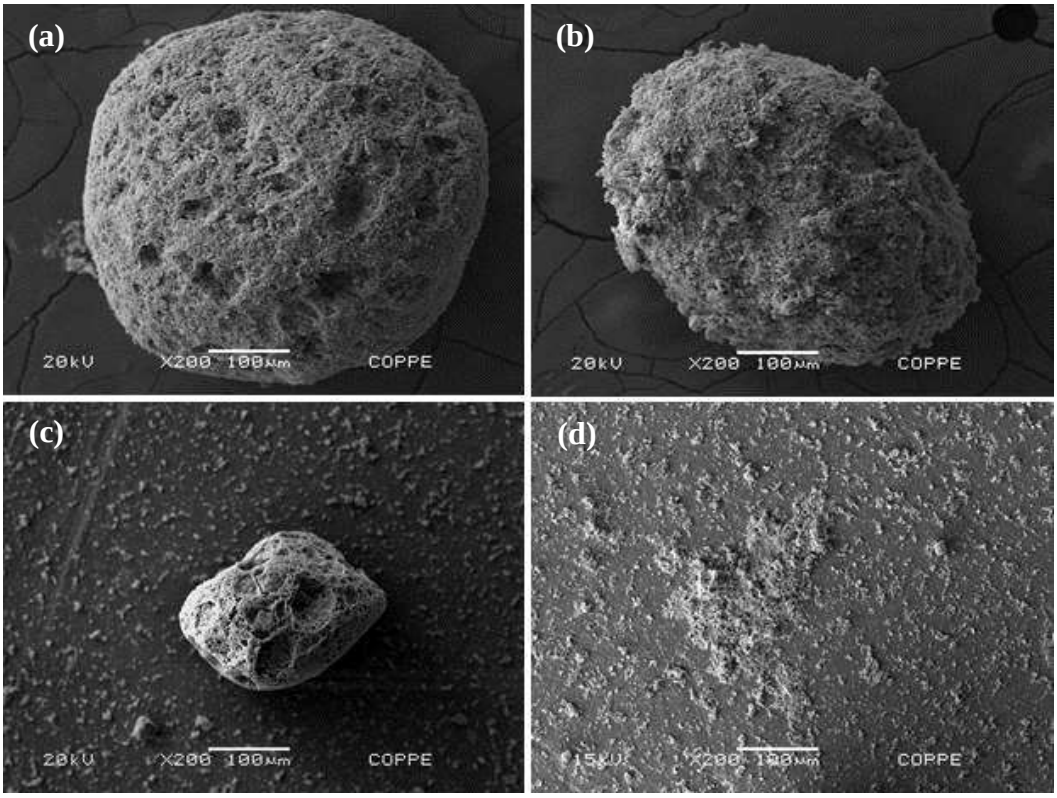


Figura 57: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando o fármaco SrRan (3,85%) após teste *in vitro* em pH 7,4 com diferentes tempos de imersão, aumento de 200x: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 7 dias e (d) 14 dias.

Analisando as micrografias com maior aumento (Figura 58) observa-se que as partículas arredondadas do β-TCP estão mais destacadas e menos matriz polimérica pode ser vista. Na Figura 58b verifica-se o aparecimento de uma segunda fase com morfologia de placas corroborando com o resultado obtido por FTIR em que as bandas de HPO_4^{2-} são identificadas (Figura 54b).

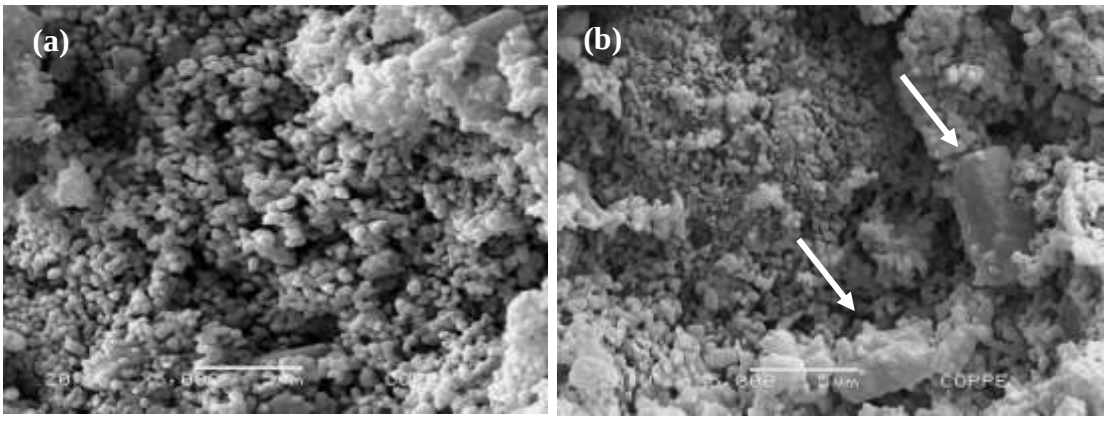


Figura 58: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando o fármaco SrRan (3,85%) após teste *in vitro* em pH 7,4 com aumento de 5.000x: (a) 24 h e (b) 14 dias.

Para as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada do fármaco Ranelato de Estrôncio (38,5%) foi realizado apenas o teste *in vitro* de dissolução e liberação em 24h de imersão (Figura 59). No pH 4,0, a liberação de cálcio é praticamente o dobro da liberação de estrôncio. Como o meio é ácido, ocorre a dissolução do β-TCP, explicando a alta concentração de cálcio. Como o íon estrôncio se encontra na superfície das microesferas, ele também é liberado. Já no pH 7,4, a liberação de Sr é maior que a de Ca devido a difusão do íon estrôncio adsorvido na superfície das microesferas. Assim, a diferença de concentração do fármaco não parece modificar o mecanismo de dissolução e liberação de estrôncio das microesferas em ambos os pHs como discutido anteriormente.

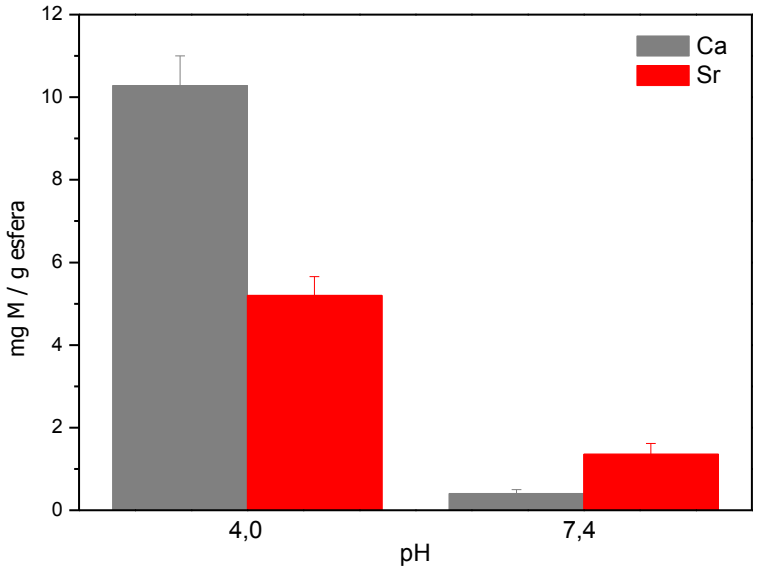


Figura 59: Concentração de cálcio e estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução concentrada de SrRan (38,5%) após 24h de imersão.

Nos testes *in vitro* realizados com as microesferas produzidas empregando o fármaco SrRan em maior concentração (38,5%), há em pH 4,0, uma liberação que corresponde a 87% de Sr e, no pH 7,4, uma liberação de 23% de Sr. Comparando-se estes valores com a porcentagem de liberação das microesferas produzidas empregando solução menos concentrada do fármaco (Tabela 11), a porcentagem de liberação de Sr das microesferas produzidas empregando solução mais concentrada são inferiores, indicando que, provavelmente, o íon estrôncio pode estar mais fortemente atraído pela superfície das microesferas, dificultando sua liberação.

Tabela 11: Porcentagem de estrôncio presente nas microesferas produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio e porcentagem de liberação do íon estrôncio durante os testes *in vitro*.

Microesferas produzidas	% Sr incorporada	% Sr liberada pH 4,0	% Sr liberada pH 7,4
SrRan (3,85%)	0,37 ± 0,020	99	69
SrRan (38,5%)	0,60 ± 0,0082	87	23

5.6 TESTES DE INCHAMENTO

O teste de inchamento verifica a capacidade que as microesferas apresentam em absorver água. Quando um polímero ou compósito entram em contato com um solvente, as moléculas do solvente se difundem ficando retidas entre as cadeias poliméricas. Isso proporciona um afastamento entre as cadeias, reduzindo as forças de atração intermoleculares polímero-polímero, o que aumenta a mobilidade das cadeias. Quando se alcança o máximo de inchamento, as cadeias poliméricas se encontram bem separadas até que parte da cadeia se rompe, provocando a erosão da matriz (LOPES, LOBO, COSTA, 2005).

Os resultados obtidos pelo teste de inchamento das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ e o fármaco SrRan estão apresentados na Figura 60. Nota-se que, praticamente, o máximo de inchamento, em ambos os meios, ocorre em 2 horas e o processo se estabiliza a partir de 6h. Esses dados corroboram com os resultados obtidos nos ensaios *in* vitro, onde se pôde observar por MEV que as microesferas se encontram bem inchadas em 24h, onde ocorre o máximo de liberação.

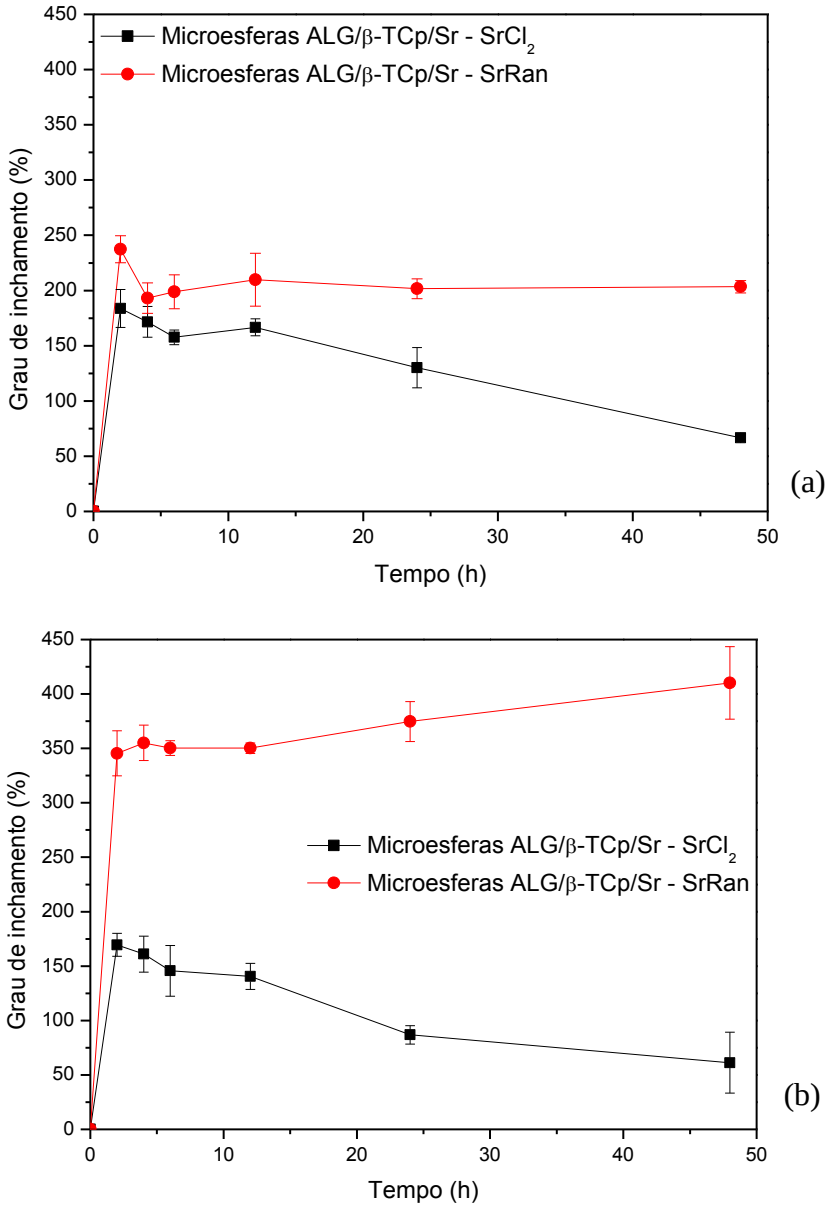


Figura 60: Perfil de inchamento das microesferas de ALG/β-TCP/Sr: (a) em água e (b) em PBS.

É possível observar que há um maior grau de inchamento para as microesferas produzidas empregando o fármaco SrRan. Esse resultado corrobora com o que foi observado nos testes *in vitro* onde o íon estrôncio é mais rapidamente liberado das microesferas (12h) e que sua porcentagem de liberação é maior quando comparada às microesferas produzidas empregando solução de $SrCl_2$.

Nota-se também que há um maior grau de inchamento no ensaio realizado em PBS em comparação com a água. Esse é um comportamento em função do pH do meio. A solução de PBS tem pH igual a 7,50 enquanto que a água ultra pura, pH 5,72 (levemente ácido). Em baixos valores de pH, há uma forte interação das carboxilas do alginato com o hidrogênio do meio, mantendo a integridade das ligações poliméricas e a estrutura "*egg box*". O processo de inchamento ocorre, porém, numa taxa mais lenta. Em pH neutro, de acordo com os valores de pKa dos ácidos manurônicos e gulurônicos (3,38 e 3,65, respectivamente), as carboxilas tendem a ficar na forma ionizada, favorecendo a troca iônica com os íons Ca^{2+} e Sr^{2+} presentes nas microesferas. Assim, há uma perda da integridade das ligações cruzadas, aumentando o inchamento. Além disso, a presença do íon fosfato e a alta concentração de eletrólitos na solução de PBS favorecem o processo de troca iônica e, consequentemente, o inchamento das microesferas (BAJPAI, SAXENA, SHARMA, 2006).

A diminuição do grau de intumescimento pode estar relacionada com o processo de erosão das microesferas (CABALLERO *et al.*, 2014). Verifica-se que as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ são as que apresentam esse perfil. Esse resultado reforça o que foi observado nos testes *in vitro* sobre o mecanismo de dissolução e liberação do íon estrôncio, que parece ser governado pelo processo de difusão e inchamento. Esse comportamento não foi observado para as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan, onde o mecanismo de dissolução e liberação do íon estrôncio parece ser governado apenas pelo processo de difusão.

Uma outra possível explicação para a diminuição do grau de intumescimento para as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ é que pelo fato da molécula de ranelato de estrôncio estar adsorvida na superfície, ela atua mantendo a integridade da microesfera, diminuindo seu grau de erosão. Por esse motivo, para as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan esse perfil não é verificado.

O comportamento de inchamento das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas pelos dois métodos, empregando $SrCl_2$ e SrRan, mostrou ser dependente do pH do meio. Isso deve ser levado em consideração ponderando o uso desse material como enxerto ósseo para a liberação controlada de estrôncio *in situ*.

5.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ e o fármaco Ranelato de Estrôncio foi avaliada por um teste multiparamétrico: XTT, NR (vermelho neutro) e CDVE (cristal violeta). A avaliação dos três testes indicou ausência de citotoxicidade das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas em ambas as metodologias.

O teste de XTT (Figura 61a) mede a atividade mitocondrial das células viáveis através da redução do sal de tetrazólio, a qual está relacionada com a viabilidade celular. Os resultados de XTT não indicaram diferenças na atividade metabólica das amostras SrCl (microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$) e Ran (microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco SrRan) em relação ao controle negativo. Diferente do controle positivo, onde a atividade metabólica, como esperado, se mostrou reduzida.

O método NR (Figura 61b) mede a permeabilidade e a integridade da membrana lisossomial e os resultados mostraram que não há redução na viabilidade entre as amostras quando comparadas ao controle, exceto para SrCl1, que apresentou aumento significativo em relação ao controle negativo, mas que não compromete negativamente a análise.

O teste por CVDE (Figura 61c) mede a densidade e proliferação celular por coloração do DNA das células vivas. Os resultados revelaram que as amostras não apresentaram diferenças na proliferação celular quando comparadas ao controle negativo.

Sendo assim, considerando os três ensaios pode-se concluir que as amostras analisadas, as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio e o fármaco Ranelato de Estrôncio não são citotóxicas.

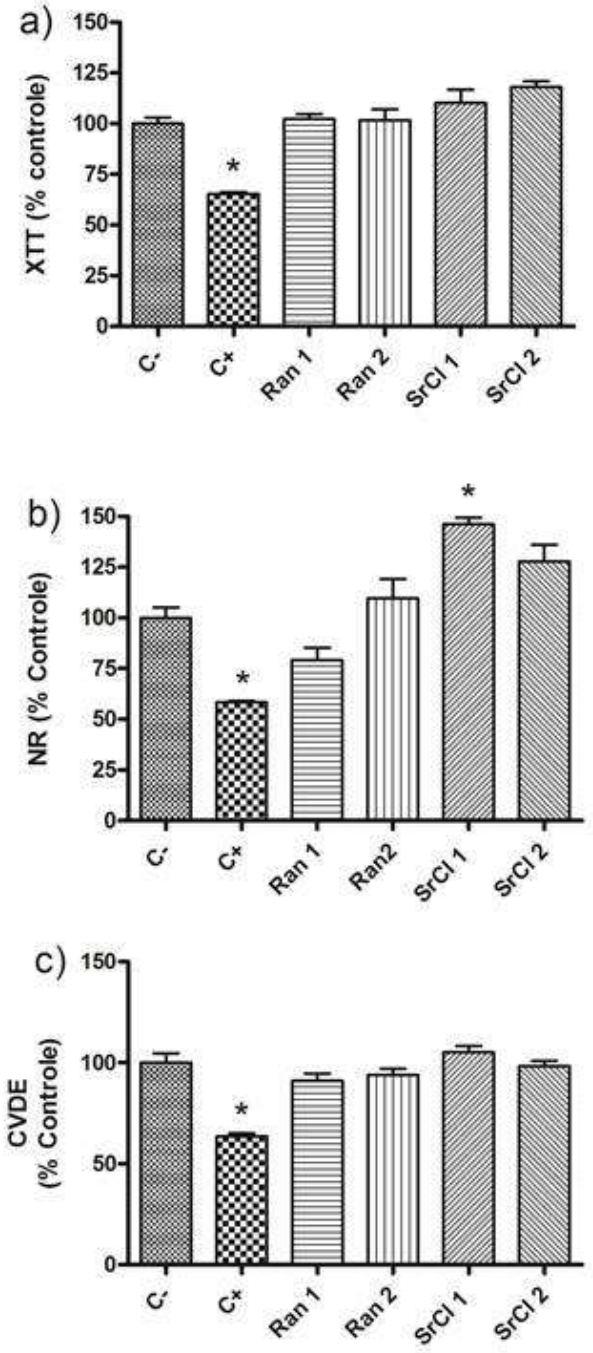


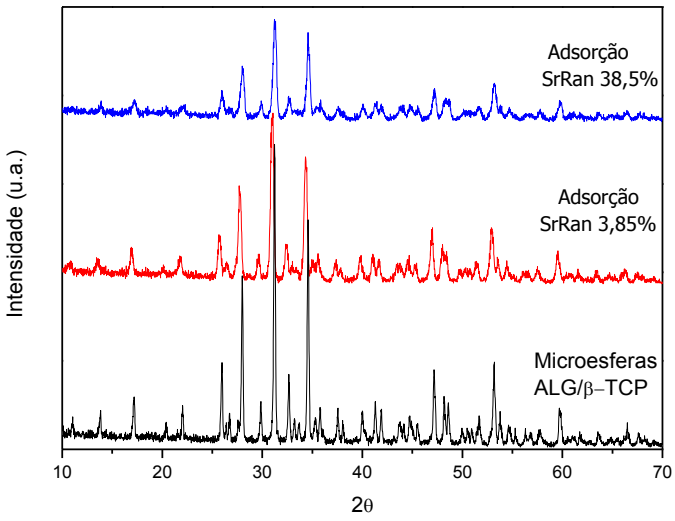
Figura 61: Ensaio de citotoxicidade e proliferação celular das microesferas de ALG/β-TCP/Sr através dos métodos: (a) XTT, (b) NR, vermelho neutro e (c) CVDE, cristal violeta. *Diferença significativa em relação aos materiais testados ($p < 0.01$).

PARTE 4 – MICROESFERAS DE ALG/β-TCP/SrRan – ENSAIO DE ADSORÇÃO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO

5.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS MICROESFERAS DE ALG/β-TCP/SrRan

5.8.1 Microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após ensaio de adsorção do fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85% p/v e 38,5%)

As microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após os ensaios de adsorção do fármaco Ranelato de Estrôncio foram analisadas por DRX (Figura 62). O difratograma mostra que as microesferas depois da adsorção apresentam seus picos com menor intensidade e alargados quando comparadas às microesferas antes do ensaio. Nas microesferas após a adsorção empregando menor concentração de SrRan 3,85% (p/v) pode ser visto um deslocamento das reflexões de Bragg para menores valores de 2θ. ROKIDI e KOUTSOUKOS (2012) relataram o mesmo tipo de deslocamento para amostras com diferentes teores de Sr.



(a)

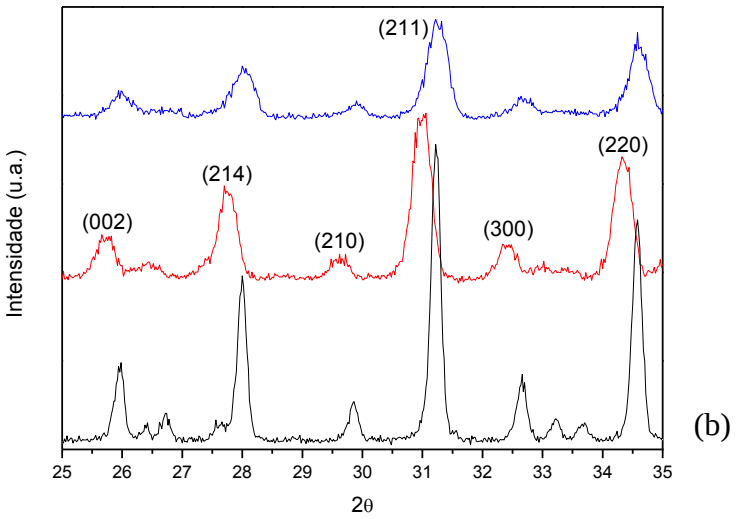


Figura 62: Difratograma de raios X das microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após ensaio de adsorção com SrRan e (b) Detalhe na região de 2θ (25 a 35º).

Os difratogramas das microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após adsorção com SrRan nas duas concentrações foi analisado utilizando o software Match! e o programa encontrou como única fase presente, o β-TCP, com 88% de grau de ajuste nos dois casos.

A Figura 63a exibe a morfologia das microesferas de ALG/β-TCP/SrRan. As microcápsulas apresentam superfície rugosa e o β-TCP interligado à matriz porosa do alginato (Figura 63b). Porém, menos reentrâncias (superfície mais uniforme) são observadas nas microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após ensaio de adsorção quando comparadas às microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas pelo processo de gelificação empregando SrRan.

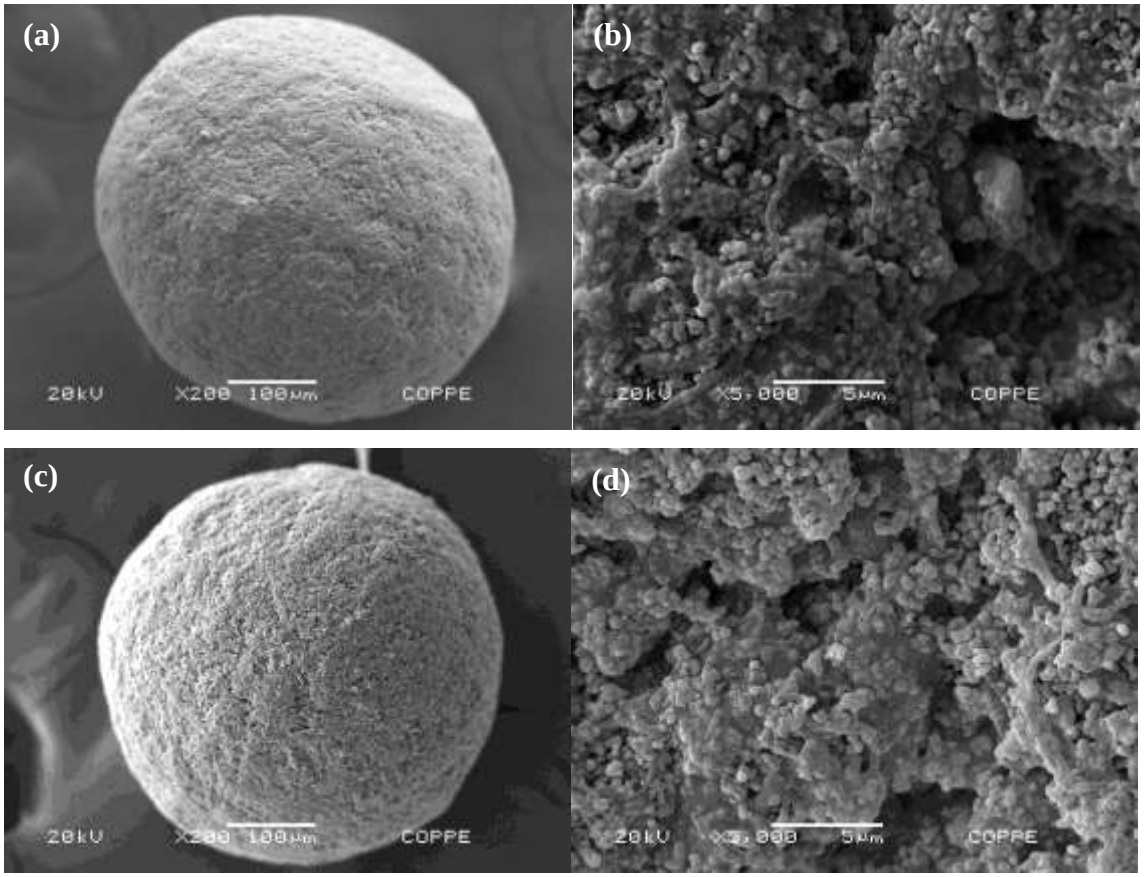


Figura 63: Micrografias das microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após ensaio de adsorção com SrRan: (a) e (b) Empregando solução menos concentrada de SrRan 3,85%; (c) e (d) Empregando solução mais concentrada de SrRan 38,5%.

5.8.2 Análise química das microesferas

O principal objetivo para a realização desse ensaio foi comprovar o processo de adsorção física do ranelato de estrôncio às microesferas e saber se a quantidade incorporada por esse processo seria maior que aquela empregando o método de produção das esferas. O teor de estrôncio presente nas microesferas de ALG/β-TCP após ensaio de adsorção com o fármaco Ranelato de Estrôncio pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12: Concentração de Sr e Ca presentes nas microesferas de ALG/β-TCP após ensaio de adsorção com SrRan.

Microesferas adsorvidas	Concentração Ca (%)	Concentração Sr (%)
SrRan (3,85% p/v)	32,06 ± 1,11	1,12 ± 0,21
SrRan (38,5% p/v)	31,41 ± 0,19	1,15 ± 0,00

A Tabela 12 mostra que a quantidade de estrôncio incorporada é praticamente a mesma independente da concentração do fármaco. Resultados semelhantes foram encontrados por CALDAS (2012), onde mais íons Sr^{2+} foram adsorvidos na superfície de microesferas de ALG/HA quando se empregava uma solução de SrRan mais concentrada.

Verifica-se que a quantidade de estrôncio presente nas microesferas pelo processo de adsorção (1,12% e 1,15%) é maior que a quantidade de estrôncio presente pelo método de produção das microesferas por gelificação empregando o SrRan (0,37% e 0,60%). Provavelmente, no processo de produção das microesferas, há uma competição dos íons Sr^{2+} com os íons Ca^{2+} presentes em solução para participar do processo de gelificação. Um indicativo desse fato é que há uma maior incorporação de íons Ca^{2+} na produção das microesferas (28,49% e 41,15%) que no processo de adsorção (31,41% e 32,06%). Neste caso, há somente a molécula de SrRan em solução e ela é quem atua na superfície da microesfera. Tanto que a quantidade de cálcio presente é aproximadamente a mesma independente da concentração do fármaco SrRan.

No ensaio de adsorção empregando as duas concentrações do fármaco SrRan (3,85% e 38,5%), não houve diferença na quantidade de estrôncio incorporada, indicando que deve haver uma saturação dos sítios de adsorção na superfície das microesferas.

Entretanto, a quantidade de estrôncio incorporada pelo processo de adsorção foi praticamente a mesma que a quantidade de estrôncio incorporada empregando o método de produção das microesferas com cloreto de estrôncio. A principal diferença entre esses dois processos é que no método de produção das microesferas com cloreto de estrôncio, a

produção das microesferas e incorporação do íon Sr são realizadas em uma única etapa, enquanto que no método de adsorção, a produção das microesferas e incorporação do íon Sr são feitas em duas etapas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescente número de lesões traumato-ortopédicas, assim como a má formação óssea, tumores e doenças ósseo degenerativas estimulam o desenvolvimento de materiais para enxerto que auxiliem no processo de regeneração óssea.

Tendo em vista os efeitos benéficos do íon estrôncio associados ao processo de remodelação óssea, a demanda por substituintes ósseos que contenham esse íon aumentou visando acelerar a regeneração do osso. Assim, a proposta para a produção das microesferas contendo estrôncio é dispor de um biomaterial para enxerto que libere este íon gradualmente. Materiais para enxerto são muito utilizados em cirurgias previamente à colocação de implantes, como o dentário, e em situações de grandes perdas ósseas.

O Ranelato de Estrôncio é um fármaco já comercializado (Protelos®) administrado oralmente como fonte de estrôncio. O ácido ranélico funciona como um quelante de estrôncio e devido às suas características físico-químicas, como alto peso molecular e elevada polaridade, ele não é metabolizado e apresenta baixa absorção, sendo facilmente eliminado. Como não é metabolizado, não possibilita uma possível transformação em um composto sem atividade, com eventuais efeitos colaterais. Além disso, permite uma rápida absorção do estrôncio, elevando seu nível plasmático.

Sendo assim, microesferas contendo esse fármaco poderiam ser também utilizadas como material para enxerto em defeitos ósseos, disponibilizando localmente o íon estrôncio, sem a preocupação com efeitos colaterais diversos. O ranelato de estrôncio também poderia funcionar como um medicamento de auxílio no controle da resposta inflamatória decorrente da implantação do biomaterial.

A produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr foi realizada pelo processo de extrusão e a incorporação do íon estrôncio foi feita juntamente com a produção dessas microesferas, ou seja, em uma única etapa, pelo uso de duas fontes distintas de estrôncio: solução de cloreto de estrôncio e o fármaco Ranelato de Estrôncio. O processo de extrusão consistiu no gotejamento, por meio de uma seringa, de uma suspensão de alginato de sódio e β-TCP em uma solução reticulante de $SrCl_2$ ou mistura de $CaCl_2$ e SrRan. Quando a gota

entra em contato com o agente gelificante (Sr^{2+} ou Ca^{2+}), ocorre o encapsulamento formando instantaneamente as microesferas de ALG/β-TCP/Sr.

O emprego de duas concentrações distintas da fonte de estrôncio teve como objetivo analisar o efeito da concentração sobre a incorporação do íon. Da mesma forma em que o uso de dois métodos diferentes de incorporação, por gelificação e por adsorção, serviria para identificar qual metodologia seria a mais eficaz na incorporação do íon estrôncio.

O método de extrusão é um processo simples, fácil de ser realizado, com parâmetros de produção (concentração da solução de alginato, velocidade de gotejamento, diâmetro da agulha e distância à solução reticulante), que de certa forma, permitem o controle do processo, de modo a produzir esferas com diâmetros numa faixa desejada. No presente trabalho, esse método propiciou a produção de diferentes faixas granulométricas, que variam de $355 < \phi < 1000$ μm. A região de estudo, limitada a $355 < \phi < 420$ μm, tendo em vista a norma ISO 10993-9, foi obtida com baixo rendimento. Porém, considerando todos os métodos de produção das microesferas, houve 74% de produtividade dentro da faixa de $355 < \phi < 600$ μm, que é a região mais empregada para a implantação.

A rota empregando solução de cloreto de estrôncio proporcionou uma maior incorporação do íon estrôncio (0,85 e 1,18%), atingindo um máximo de liberação em 24 horas. Enquanto que a rota empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio proporcionou uma menor incorporação do íon (0,37 e 0,60%). Considerando a eficácia do biomaterial em função da quantidade de estrôncio incorporada e custo do processo, a rota empregando solução de cloreto de estrôncio seria a mais adequada, pois apresenta menor custo e maior quantidade de estrôncio.

A diferença observada no comportamento das duas rotas pode estar relacionada com a disponibilidade do íon estrôncio em solução. O $SrCl_2$ é um sal altamente solúvel (547g/L), enquanto que o SrRan apresenta baixa solubilidade (0,8g/L). Dessa forma, uma maior quantidade de íons Sr^{2+} se encontra em solução para participar do processo de gelificação quando se emprega a solução de $SrCl_2$. Além disso, como o SrRan é uma molécula volumosa e pouco solúvel em água, a tendência maior é que ele se adsorva à superfície das microesferas, já que existe grande quantidade de íons cálcio presente na solução reticulante (solubilidade $CaCl_2$ igual a 813g/L) para participar do processo de gelificação.

A rota empregando solução menos concentrada de cloreto de estrôncio (0,15 mol.L^{-1}) teve um valor bem próximo (0,14 mmol.L^{-1}) à concentração mínima de estrôncio que apresenta atividade nos processos de absorção e reabsorção óssea (0,181 mmol.L^{-1}) segundo DELANNOY, BAZOT, MARIE (2002). Enquanto que a rota empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio, mesmo em sua maior concentração (38,5%), o nível de estrôncio (0,07 mmol.L^{-1}) ficou abaixo da concentração mínima necessária. Uma alternativa para aumentar a quantidade incorporada seria produzir microesferas com menor diâmetro empregando uma e maior quantidade de poros para aumentar a área de superfície.

Considerando as microesferas de ALG/β-TCP/SrRan, a produção foi realizada pelo processo de extrusão, utilizando o cloreto de cálcio como agente gelificante e a incorporação do íon estrôncio foi feita pelo mecanismo de adsorção física, ou seja, duas etapas foram necessárias para alcançar o produto final.

O método de adsorção do SrRan às microesferas poderia ser escolhido como o mais eficiente em termos de quantidade de estrôncio (1,12 e 1,15%) e considerando as vantagens da presença do fármaco. Porém, deve ser levado em consideração que nesse processo foram empregadas duas etapas e que o tempo necessário para a fabricação do produto foi maior. Além disso, o fato de que na adsorção as forças de ligação são mais fracas, faz com que o tempo de liberação seja curto. Isso poderia implicar em uma alta dose de estrôncio em pouco tempo no sítio implantado, conduzindo a uma maior chance de desenvolver um processo inflamatório e de efeitos colaterais.

A liberação de um fármaco em matrizes poliméricas pode seguir os seguintes mecanismos: difusão, intumescimento e erosão. No processo de difusão, o meio difunde-se para o interior da matriz, o fármaco dissolve-se e difunde-se para fora da matriz. O processo de intumescimento, inicia-se pela difusão, a matriz apresenta alta capacidade de absorção de água sem se dissolver, liberando o fármaco. Na erosão, há difusão da água para o interior da matriz, hidratação e dilatação até o rompimento da matriz, onde o fármaco é liberado.

Geralmente, a liberação de fármacos a partir de matrizes de alginato é governada pelo processo de difusão e facilitada pela erosão da matriz. Esses dois processos são dependentes do pH do meio, pois alterações no pH influenciam a hidratação do alginato e a reologia do gel.

Analogamente, considerando o ensaio de dissolução das microesferas obtidas pelas duas rotas de incorporação do íon estrôncio e sua liberação, há uma combinação desses três mecanismos. Inicialmente, tem-se o processo de difusão do meio; em seguida, com o aumento do tempo de imersão, há um maior inchamento das microesferas, e posteriormente, ocorre a ruptura da matriz polimérica causada pelo aumento da pressão interna, resultando na erosão.

Esses mecanismos ocorrem numa taxa mais ou menos rápida em função do pH da solução tampão dos testes *in vitro*. Isso porque o alginato e o ranelato possuem carboxilas que podem estar protonadas ou dissociadas em função do pH do meio. Em pH 4,0, as carboxilas do alginato se ligam ao H^+ presente no fluido, liberando o íon Sr^{2+} e, com isso, diminuindo a taxa de intumescimento. Para as microesferas contendo SrRan, além da influência da matriz do alginato, nesse pH, uma das carboxilas do ácido ranélico também está ligada ao H^+ do meio. Por esse motivo, o que determina a liberação do íon estrôncio é a dissolução do β-TCP. Em pH 7,4, as carboxilas do alginato se encontram totalmente dissociadas (pKa dos ácidos manurônicos e gulurônicos é de 3,38 e 3,65, respectivamente), facilitando o processo de inchamento e, consequente, erosão da matriz. Da mesma forma, todas as quatro carboxilas do ácido ranélico encontram-se dissociadas (pKa_1 = 1,50; pKa_2 = 2,00; pKa_3 = 2,90; pKa_4 = 3,60 e pKa_5 = 4,80). Assim, o que determina a liberação do íon estrôncio, nesse pH, é o processo de inchamento e erosão da matriz.

Outro fator que influencia o mecanismo de dissolução e liberação do íon estrôncio são as forças de ligação atuantes entre o íon e o compósito. Para as microesferas produzidas pelo processo de gelificação empregando $SrCl_2$, o íon estrôncio está ligado quimicamente às microesferas através de ligações coordenadas. Para as microesferas produzidas empregando o fármaco SrRan, sejam elas produzidas pelo processo de extrusão ou adsorção, o íon estrôncio está ligado fisicamente através de interações do tipo van der Waals. Portanto, quanto mais forte for a ligação, maior o tempo necessário para que ele seja liberado. Por esse motivo, o íon estrôncio é liberado mais rapidamente (12h) das microesferas produzidas empregando o fármaco SrRan quando comparado com sua liberação (24h) das microesferas produzidas empregando $SrCl_2$.

Embora ainda distante do que acontece no corpo, os testes *in vitro* de dissolução e liberação de estrôncio permitiram uma visão do processo e talvez proponham uma extrapolação para o comportamento *in vivo* das microesferas produzidas.

7 CONCLUSÕES

1) O processo de produção por extrusão das microesferas e incorporação do íon estrôncio empregando solução de cloreto de estrôncio foi eficaz, resultando num rendimento da ordem de 97% com incorporação de 1,18% e 0,85% de Sr para a solução de 0,15 e 1,50 $mol.L^{-1}$ de $SrCl_2$, respectivamente, estando o íon estrôncio presente preferencialmente na superfície das microesferas.

2) Na produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando solução de cloreto de estrôncio, a incorporação do íon estrôncio ocorre pelo mecanismo de gelificação do alginato com o metal proveniente da solução de cloreto de estrôncio.

3) A liberação de estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de cloreto de estrôncio (0,15 e 1,50 $mol.L^{-1}$) em pH 4,0 foi de 48% e 89% (solução menos e mais concentrada, respectivamente) e parece ser governada pelo mecanismo de difusão e dissolução. Enquanto que, no pH 7,4, a liberação de estrôncio das microesferas foi de 14% e 51% e parece ser governada pelo processo de difusão e inchamento das microesferas.

4) O processo de produção por extrusão das microesferas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio foi eficaz na incorporação do íon estrôncio, onde a produção das microesferas e incorporação do íon ocorreram em uma única etapa, produzindo microesferas de ALG/β-TCP/Sr com rendimento da ordem de 92% e incorporação de 0,37% e 0,60% de Sr para a solução de 3,85 e 38,5% do fármaco, respectivamente, apresentando o íon estrôncio presente preferencialmente na superfície das microesferas.

5) Na produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio, a gelificação parece acontecer com o metal proveniente da solução de

cloreto de cálcio e a incorporação do íon estrôncio provavelmente ocorre por um mecanismo de adsorção física.

6) A liberação de estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando o fármaco Ranelato de Estrôncio (3,85 e 38,5%) em pH 4,0 foi de 99% e 87%, respectivamente e parece ser governada pelo mecanismo de difusão e dissolução. Enquanto que, no pH 7,4, a liberação de estrôncio das microesferas foi de 69% e 23% e parece ser governada pelo processo de difusão.

7) No processo de adsorção de SrRan às microesferas, a quantidade de íon estrôncio incorporada (1,12 e 1,15%) é maior quando comparada ao método de produção das microesferas pelo processo de extrusão. Porém, para a produção das microesferas de ALG/β-TCP/SrRan foram empregadas duas etapas de produção, enquanto que pelo processo de gelificação, a produção e incorporação são feitas em uma única etapa.

8) A concentração da solução empregada para a produção das microesferas influencia na quantidade de estrôncio incorporada. Se o método empregado for o processo de gelificação com $SrCl_2$, quanto menor a concentração, maior a incorporação. Se o método empregado for a adsorção do SrRan, quanto maior a concentração do fármaco, maior a incorporação.

9) O mecanismo de dissolução e liberação do íon estrôncio parece ser influenciado pelo método de produção das microesferas e está relacionado com o tipo de ligação atuante. Se o método empregado for o processo de gelificação, o mecanismo predominante é a difusão e intumescimento das microesferas. Se o método empregado for o processo de adsorção, o mecanismo predominante é somente a difusão.

10) Não foram observadas mudanças físico-químicas significativas nas microesferas produzidas e após a liberação *in vitro*.

11) As microesferas de ALG/β-TCP/Sr obtidas pelas duas rotas (solução de cloreto de estrôncio 0,15 $mol.L^{-1}$ e ranelato de estrôncio 3,85%), não apresentaram citotoxicidade, segundo os testes multiparamétricos de XTT, NR e CDVE.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1) Teste de dessorção do ranelato de estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/Sr.

2) Teste de dessorção do ranelato de estrôncio das microesferas de ALG/β-TCP/SrRan após ensaio de adsorção.

3) Quantificação do ranelato de estrôncio nas microesferas de ALG/β-TCP/Sr obtidas por Espectroscopia no Ultravioleta-Visível.

4) Simulação da matriz orgânica para leitura de estrôncio por Espectrofotometria de Absorção Atômica.

5) Testes *in vivo* aplicando as microesferas de ALG/β-TCP/Sr produzidas empregando solução de $SrCl_2$ e microesferas de ALG/β-TCP/SrRan.

6) Produção de microesferas de ALG/Sr-β-TCP e ensaios de liberação *in vitro*. Nesse caso, o íon estrôncio está ligado quimicamente ao β-TCP, fazendo parte da estrutura cristalina do material. Assim, espera-se que o comportamento das microesferas frente aos testes *in vitro* seja distinto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT *et al*. **Anhydrate and hydrate forms of strontium ranelate.** WIPO Patent Application WO/2010/034806.

ALKHRAISAT *et al.* **Strontium modified biocements with zero order release kinetics.** Biomaterials. 2008; 29:4691-97.

AMMANN et al. **Strontium Ranelate Improves Bone Resistance by Increasing Bone Massand Improving Architecture in Intact Female Rats**. Journal of Bone and Mineral Research. 2004; 19(12): 2012-20.

AZEVEDO, E.; TAVARES, L.N.; CHAHADE, W.H. **Medicamentos e substâncias químicas indutoras das síndromes osteopênicas e de osteoporose**. Disponível em: <www.nedo.pt/items/medicamentos_indutores_osteoporose.pdf>. Acesso em: 06 de dezembro de 2013.

BAJPAI S.K., SHARMA S. **Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions**. Reactive & Functional Polymers. 2004; 59:129-40.

BAJPAI S.K., SAXENA S.K., SHARMA S. **Swelling behavior of barium ions-crosslinked bipolymeric sodium alginate-carboxymethyl guar gum blend beads**. Reactive & Functional Polymers. 2006; 66:659-66.

BIDARRA, S.J.; BARRIAS, C.C.; GRANJA, P.L. **Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering.** Acta Biomaterialia. 2014; 10:1646-62.

BIGI *et al.* **Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals.** Inorganica Chimica Acta. 2007; 360:1009-16.

BLAKE *et al*. **A review of strontium ranelate and its effect on DXA scans.** Journal of Clinical Densitometry. 2007; 10(2):113-19.

BLAKE, G.M.; FOGELMAN, I. **The correction of BMD measurements for bone strontium content**. Journal of Clinical Densitometry. 2007; 10(3): 259-65.

BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. **Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature**. Acta Biomaterialia. 2010; 6: 1882-94.

BOFF *et al.* **Important aspects regarding the role of microorganisms in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws**. Archives of Oral Biology Biology. 2014; 59: 790-99.

BOIVIN G.; DOUBLIER A.; FARLAY, D. **Strontium ranelate – a promising therapeutic principle in osteoporosis. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 2012; 26: 153-56.

BOHNER, M. **Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements**. Injury International Journal of the Care of the Injury. 2000; 31:S-D37-47.

BOROJEVIC, R. **Medicina regenerativa: terapias celulares, bioengenharia e biomimética**. Seminários temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas. Junho, 2005.

BOSE, S.; TARAFDER, S. **Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review**. Acta Biomaterialia. 2012; 8:1401-21.

BRONNER, F. **Metals in bone: Aluminum, Boron, Cadmium, Chromium, Lanthanum, Lead, Silicon, and Strontium**. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. Principles of Bone Biology. Oxford, UK. Academic Press Elsevier, 2008. 3rd ed., v. 1, c. 25, p. 524-526.

BUSSE *et al.* **Effects of strontium ranelate administration on bisphosphonate-altered hydroxyapatite: Matrix incorporation of strontium is accompanied by changes in mineralization and microstructure**. Acta Biomaterialia. 2010; 6: 4513-21.

CABALLERO *et al.* **Characterization of alginate beads loaded with ibuprofen lysine salt and optimization of the preparation method**. International Journal of Pharmaceutics. 2014; 460:181-88.

CALDAS, R. J. **Estudo da incorporação de estrôncio no mineral do dente incisivo e osso de rato sob administração sistêmica e local de Ranelato de Estrôncio**. 2012. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2012.

CAMCIOGLU *et al.* **Effects of strontium ranelate, raloxifene and misoprostol on bone mineral density in ovariectomized rats.** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2009; 147:192-94.

CAPUCCINI *et al*. **Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response**. Acta Biomaterialia. 2008; 4:1885-93.

CGEE. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Materiais avançados: 2010-2022.** Brasília. 2010.

CHAN-HEN, DAVID CHEN *et al.* **Controlled release of gentamicin from calcium phosphate/alginate bone cement.** Materials Science and Engineering C. 2011; 31:334-41.

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G.A. **Elastomeric biomaterials for tissue engineering**. Progress in Polymer Science. 2013; 38:584-71.

CHOW, L.C.; MARKOVIC, M.; TAKAGI, S. **A dual constant-composition titration system as an in vitro resorption model for comparing dissolution rates of calcium phosphate biomaterials**. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2003; 65B:245-51.

DAHL *et al.* **Incorporation and distribution of strontium in bone**. Bone. 2001; 28(4):446-53.

DASH *et al.* **Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems**. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research. 2010; 67(3):217-23.

DESCAMPS, M.; HORNEZ, J.C.; LERICHE, A. **Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications**. Journal of the European Ceramic Society. 2009; 29:369-75.

DE PAULA *et al.* **Hydroxyapatite-alginate biocomposite promotes bone mineralization in different length scales in vivo**. Frontiers of Materials Science in China. 2009; 3(2): 145-53.

DAGANG, GUO *et al.* **Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement**. Biomaterials. 2005; 26:4073-83.

DELANNOY, P.; BAZOT, D.; MARIE, P.J. **Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice**. Metabolism., 2002; 51(7):906-11.

DOROZHKIN, S.V. **A Review on the dissolution models of calcium apatites**. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials. 2002; 45-61.

ENGEL *et al.* **Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side.** Trends in Biotechnology. 2008; 26(1):39-47.

FORSGREN, J.; ENGQVIST, H. **A novel method for local administration of strontium from implant surfaces.** Journal of Material Science. 2010; 21:1605-09.

FULMER *et al*. **Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites**. Biomaterials. 2002; 23:751-55.
GENTLEMAN *et al.* **The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts *in vitro***. Biomaterials. 2010; 31:3949-56.

GINEBRA *et al*. **Calcium phosphate cements as drug delivery materials.** Advanced Drug Delivery Reviews. 2012; 64:1090-110.

GOH, C.H.; HENG, P.W.S.; CHAN, L.W. **Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications.** Carbohydrate Polymers. 2012; 88:1-12.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. **Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos**. Química Nova. 2010; 33(6):1352-58.

GUO-XIN, NI *et al.* **The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts in vitro.** Journal of Material Science: Materials in Medicine 2011; 22:961-67.

HERNÁNDEZ *et al.* **Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery**. Advanced Drug Delivery Reviews. 2010; 62:711-30.

HOLZAPFEL *et al*. **How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view**. Advanced Drug Delivery Reviews. 2013; 65:581-603.

HONG-RU, LIN *et al*. **Effect of polysaccharide nanocrystals on structure, properties, and drug release kinetics of alginate-based microspheres**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2011; 85:270-9.

IGNJATOVIĆ *et al*. **Micro- and nano-injectable composite biomaterials containing calcium phosphate coated with poly(DL-lactide-co-glycolide)**. Acta Biomaterialia. 2007; 3:927-35.

International Organization for Standardization ISO 10993-9:1994. **Biological evaluation of medical devices. Part 9: Degradation of materials related to biological testing**. 1994. p. 12.

JAY, S.M.; SALTZMAN, W.M. **Controlled delivery of VEGF via modulation of alginate microparticle ionic crosslinking.** Journal of Controlled Release. 2009; 134:26-34.

JONG-SHING, BOW; SZ-CHIAN, LIOU; SAN-YUAN, CHEN. **Structural characterization of room-temperature synthesized nano-sized β-tricalcium phosphate**. Biomaterials. 2004; 25:3155-61.

JUNIOR, A.I.S.; BIDART, A.M.F.; CASSELA, R.J. **Absorção atômica**. p. 1-17. Disponível em: <http://www.ifrj.edu.br/webfm_send/545>. Acesso em: 04 de abril de 2014.

KAILI, LIN; CHENGTIE, WU; JIANG, CHANG. **Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape**. Acta Biomaterialia. 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.017

KAI, QIU *et al.* **Effect of strontium ions on the growth of ROSI17/2.8 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds.** Biomaterials. 2006; 27:1277-86.

KAKLAMANI *et al.* **Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation.** Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.04.013>. Acesso em: 06 de maio de 2014.

KANNAN *et al.* **Synthesis and structural characterization of strontium - and magnesium-co-substituted β-tricalcium phosphate**. Acta Biomaterialia. 2010; 6:571-76.

KASHIMA, K.; IMAI, M. **Advanced membrane material from marine biological polymer and sensitive molecular-size recognition for promising separation technology**. InTech. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/50734>. Acesso em: 19 de maio de 2014.

KEATING, F.S.J.; STEVENSON, J.C. **Treatment of the Postmenopausal Woman.** Third Edition. 2007. Chapter 28. Interventions for osteoporosis. p. 351-75.

KLEINBERGER *et al.* **Systematic study of alginate-based microcapsules by micropipette aspiration and confocal fluorescence microscopy**. Materials Science and Engineering C 33. 2013; 4295-304.

KUO C.K; MA, P.X. **Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties**. Biomaterials. 2001; 22:511-21.

LAM *et al*. **Strontium-substituted calcium phosphates prepared by hydrothermal method under linoleic acid–ethanol solution**. Ceramics International. 2010; 36:683-88.

LANDI *et al.* **Development of Sr and CO_3 co-substituted hydroxyapatites for biomedical applications**. Acta Biomaterialia. 2008; 4: 656-63.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. **Tissue Engineering**. Science. 1993; 260:920-26

LEE, K.Y.; MOONEY, D.J. **Alginate: Properties and biomedical applications**. Progress in Polymer Science. 2012; 37:106-26.

LERMAN *et al.* **Conservative management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Staging and treatment outcomes**. Oral Oncology. 2013; 49: 977-83.

LI *et al.* **Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite.** Biomaterials. 2007; 28:1452-60.

LIANG, L.; RULIS, P.; CHING, W.Y. **Mechanical properties, electronic structure and bonding of α and β-tricalcium phosphates with surface characterization**. Acta Biomaterialia. 2010; 6:3763-71.

LIMA, I. R. **Efeito do zinco na biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de grânulos de zinco-apatita 5% em comparação com a Hidroxiapatita.** 2006. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2006.

LIN, SANG *et al.* **Bone-like nanocomposites based on self-assembled protein-based matrices with Ca^{2+} capturing capability.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2010; 21:2561-68.

LIU, C.; XIA, Z. CZERNUSZKA, J.T. **Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering**. Chemical Engineering Research and Design. 2007; 85(A7):1051-64.

LIU, X.; MA, P. X. **Polymeric scaffolds for bone tissue engineering.** Annals of Biomedical Engineering. 2004; 32(3):477-86.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. **Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrifílicos**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005; 41(2):143-54.

LUPO *et al.* **Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols**. Food Hydrocolloids. 2014; 38:56-65.

MARIE, P.J. **Strontium ranelate: A novel mode of action optimizing bone formation and resorption.** Osteoporosis International. 2005; 16: S7-S10.

MARIE, P.J. **Strontium ranelate: A physiological approach for optimizing bone formation and resorption**. Bone. 2006; 38: S10-S14.

MASATOMO, YASHIMA *et al.* **Crystal structure analysis of β-tricalcium phosphate $Ca_3(PO_4)_2$ by neutron powder diffraction**. Journal of Solid State Chemistry. 2003; 175:272-77.

MENAA, F.; MENAA, A.; MENAA, B. **Hyaluronic acid and derivatives for tissue engineering**. Journal of Biotechnology & Biomaterials. 2011; S3:001.

MENTAVERRI *et al*. **Potential Anti-Catabolic and Anabolic Properties of Strontium Ranelate**. Current Molecular Pharmacology. 2012; 5: 189-194.

MØRCH *et al.* **Effect of Ca^{2+}, Ba^{2+}, and Sr^{2+} on alginate microbeads.** Biomacromolecules. 2006; 7:1471-80.

MOREIRA, A. P. D., **Síntese e caracterização de carbonato apatitas nanoestruturadas**. 2006. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2006.

MOURIÑO, V.; BOCCACCINI, A.R. **Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds.** Journal of the Royal Society. 2010; 7:209-227.

MYTHILI *et al.* **Development and validation of rp-hplc method for the estimation of strontium ranelate in sachet.** International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011; 2: 258-263.

NAVARRO *et al.* **Biomaterials in orthopaedics**. Journal of the Royal Society Interface. 2008; 5:1137-58.

NAVEAU, B. **Strontium: a new treatment for osteoporosis**. Joint Bone Spine. 2004; 71:261-63.

NIELSEN, S.P. **The biological role of strontium**. Bone. 2004; 35:583-88.

NOF. National Osteoporosis Foundation. "**Osteoporosis medicines: what you need to** know". Disponível em: <http://www.nof.org/node/182>. Acesso em: 05 de novembro de 2011.

O'BRIEN, F.J. **Biomaterials & scaffolds for tissue engineering**. Materials Today. 2011; 14(3): 88-95.

OLIVEIRA *et al.* **Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas. 2010; 9:37-44.

OSTEOPOROSE. "**Causas da osteoporose**". Disponível em: <http://www.osteoporose.com.pt/causas/index.cfm>. Acesso em: 03 de novembro de 2011.

PAWAR, S.N.; EDGAR, K.J. **Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications.** Biomaterials. 2012; 33:3279-3305.

PERERA *et al.* **Clarifying the effect of sintering conditions on the microstructure and mechanical properties of β-tricalcium phosphate**. Ceramics International. 2010; 36:1929-35.

PLACE *et al.* **Strontium- and zinc-alginate hydrogels for bone tissue engineering.** Tissue engineering: Part A. 2011; 17(21 and 22):2713-22.

QUAN, LIU *et al.* **The effect of excess phosphate on the solubility of hydroxyapatite**. Ceramics International. 2014; 40: 2751-61.

RAJKUMAR, M.; MEENAKSHISUNDARAM, N.; RAJENDRAN, V. **Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: Synthesis and characterization**. Materials Characterization. 2011; 62:469-79.

REGINSTER, J.Y.; MEUNIER, P.J. **Strontium ranelate phase 2 dose-ranging studies: PREVOS and STRATOS studies**. Osteoporosis International. 2003; 14 (Supplement 3): S56-S65.

REGINSTER *et al.* **Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: Results at 8 years**. Bone. 2009; 45:1059-64.

RIBEIRO, C. **Processamento e caracterização de cerâmicas à base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico**. 2003. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2003.

RIBEIRO, C.C.; BARRIAS, C.C.; BARBOSA, M.A. **Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices**. Biomaterials. 2004; 25:4363-73.

ROKIDI, S.; KOUTSOUKOS, P.G. **Crystal growth of calcium phosphates from aqueous solutions in the presence of strontium**. Chemical Engineering Science. 2012; 77:157-64.

ROSSI *et al.* **Ultrastructure of regenerated bone mineral surrounding hydroxyapatite-alginate composite and sintered hydroxyapatite**. Bone . 2012; 50:301-10.
ROY, A.; BAJPAI, J.; BAJPAI, A.K. **Dynamics of controlled release of chlorpyrifos from swelling and eroding biopolymeric microspheres of calcium alginate and starch**. Carbohydrate Polymers. 2009; 76: 222-31.

RUGGIERO *et al.* **Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases**. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2004; 62(5):527-34.

SAIDAK, Z.; MARIE, P.J. **Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis.** Pharmacology & Therapeutics. 2012; 136: 216-26.

SALTZMAN, W.M. **Tissue Engineering – Principles for the design of replacement organs and tissues**. 2004. Oxford University Press, Inc. p. 5-15.

SAMAVEDI, S.; WHITTINGTON, A.R.; GOLDSTEIN, A.S. **Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior.** Acta Biomaterialia. 2013; 9:8037-45.

SÁNCHEZ-SALCEDO *et al*. **In vitro structural changes in porous HA/β-TCP scaffolds in simulated body fluid**. Acta Biomaterialia. 2009; 5:2738-51.

SARMENTO *et al.* **Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies.** Carbohydrate Polymers. 2006; 66(1):1-7.

SES. Secretaria Estadual de Saúde do Distrito Federal. "**Década do osso**". Disponível em: <http://www.saude.df.gov.br/005/00502001.asp?ttCD_CHAVE=9020>. Acesso em: 29 de novembro de 2011.

SHI *et al.* **Parametric analysis of shape changes of alginate beads.** Powder Technology. 2011; 210:60-66.

SILVA, H. M. **Avaliação *in vitro* de hidroxiapatita contendo silício sob condições estática e dinâmica.** 2009. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2010.

SOARES, G. A. **Biomateriais**. CGEE. Fórum de Biotecnologia em Biomateriais. Dezembro, 2005.

SON *et al*. **Effect of alginate as polymer matrix on the characteristics of hydroxyapatite nanoparticles.** Materials Chemistry and Physics. 2012; 132:1041-47.

SOO-HONG, LEE; HEUNGSOO, SHIN. **Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering.** Advanced Drug Delivery Reviews. 2007; 59:339-59.

SUGANTHI *et al.* **Fibrous growth of strontium substituted hydroxyapatite and its drug release**. Materials Science and Engineering C. 2011; 31: 593-99.

SUN, F.; ZHOU, H.; LEE, J. **Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration**. Acta Biomaterialia. 2011; 7: 3813-28.

SUN, J.; TAN, H. **Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. Materials**. 2013; 6:1285-1309.

SWAMI A.S.; PISHAWIKAR, S.A.; MORE, H.N. **UV – Spectrophotometric method development and validation for estimation of strontium ranelate in bulk**. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2012; 3(4): 171-76.

SZ-CHIAN, L. *et al.* **Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders.** Biomaterials. 2004; 25:189-96.

TABATA, Y. **Review: Biomaterial technology for tissue engineering applications**. Journal of the Royal Society Interface. 2009; 6:S311-24.

TAMPIERI *et al*. **HA/alginate hybrid composites prepared through bio-inspired nucleation.** Acta Biomaterialia. 2005; 1:343-51.

TODOLÍ, J-L.; MERMET, J-M. **Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction**. Spectrochimica Acta Part B. 1999; 54: 895-929.

TOSHIMA *et al*. **Morphology control of brushite prepared by aqueous solution synthesis**. Journal of Asian Ceramic Societies 2. 2014; 52-56.

VAHABZADEH, S.; EDGINGTON, J.; BOSE, S. **Tricalcium phosphate and tricalcium phosphate/polycaprolactone particulate composite for controlled release of protein**. Materials Science and Engineering C. 2013; 33(7):3576-82.

VERBERCKMOES, S.C.; DE BROE, M.E., D'HAESE, P.C. **Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization**. Kidney International. 2003; 64: 534-43.

WEIBIN, ZHANG *et al*. **Effects of strontium in modified biomaterials.** Acta Biomaterialia. 2011; 7: 800 -08.

WILSON *et al*. **Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite.** Biomaterials. 2005; 26:1317-27.

WOHL *et al.* **Accumulation of bone strontium measured by in vivo XRF in rats supplemented with strontium citrate and strontium ranelate**. Bone. 2013; 52: 63-69.

XIE *et al.* **Alginate-controlled formation of nanoscale calcium carbonate and hydroxyapatite mineral phase within hydrogel networks**. Acta Biomaterialia. 2010; 3:3665-75.

YIN, X.; STOTT, M. J.; RUBIO, A. **α- and β-tricalcium phosphate: A density functional study**. Physical Review B. 2003; 68: 205205-1 – 205205-8.

ZHANG, J.; WANG, Q.; WANG, A. **In situ generation of sodium alginate/hydroxyapatite nanocomposite beads as drug-controlled release matrices.** Acta Biomaterialia. 2010; 6:445-54.

ZOU *et al*. **Characterization and dissolution‑reprecipitation behavior of biphasic tricalcium phosphate powders**. Journal of Alloys and Compounds. 2011; 509:6852-58.

ZREIQAT *et al.* **The incorporation of strontium and zinc into a calcium–silicon ceramic for bone tissue engineering**. Biomaterials. 2010; 31: 3175-84.

APÊNDICE

Analisando a molécula de ranelato de estrôncio (Figura 5), o sal é um composto iônico derivado de um ácido fraco (ácido ranélico) e uma base forte (hidróxido de estrôncio). A força de um ácido está relacionada com seu grau de dissociação (constante de dissociação ácida, Ka). Quanto maior o valor de Ka, mais forte é o ácido, pois maior sua dissociação (SKOOG *et al.*, 2013). Para o ácido ranélico, seus valores de pKa (CARVALHO, NETO, MARQUES, 2014), estão descritos segundo as equações:

$H_5Ran^+ + H_2O \rightarrow H_4Ran + H_3O^+$ $pKa_1 < 1,50$ (Equação 1A)

$H_4Ran + H_2O \rightarrow H_3Ran^- + H_3O^+$ $pKa_2 = 2,00$ (Equação 2A)

$H_3Ran^- + H_2O \rightarrow H_2Ran^{-2} + H_3O^+$ $pKa_3 = 2,90$ (Equação 3A)

$H_2Ran^{2-} + H_2O \rightarrow HRan^{-3} + H_3O^+$ $pKa_4 = 3,60$ (Equação 4A)

$HRan^{-3} + H_2O \rightarrow Ran^{-4} + H_3O^+$ $pKa_5 = 4,80$ (Equação 5A)

Considerando que o pH da solução para a produção das microesferas de ALG/β-TCP/Sr é igual a 7,27 quando emprega-se uma menor concentração do fármaco SrRan (3,85%) e o ranelato de estrôncio sendo pouco solúvel em água (EMA, 2012), pode-se descrever sua dissociação em meio aquoso pela reação:

$SrRan \rightarrow 2\ Sr^{2+} + Ran^{4-}$ (Equação 6A)

$2H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^-$ (Equação 7A)

O ânion ranelato, Ran^{4-} pode sofrer hidrólise de acordo com as reações e seus respectivos valores de pKb:

$Ran^{-4} + H_2O \rightarrow HRan^{-3} + OH^-$ $pKb_1 < 12,50$ (Equação 8A)

$HRan^{-3} + H_2O \rightarrow H_2Ran^{-2} + OH^-$ $pKb_2 = 12,0$ (Equação 9A)

$H_2Ran^{-2} + H_2O \rightarrow H_3Ran^- + OH^-$ $pKb_3 = 11,1$ (Equação 10A)

$H_3Ran^- + H_2O \rightarrow H_4Ran + OH^-$ $pKb_4 = 10,4$ (Equação 11A)

$H_4Ran + H_2O \rightarrow H_5Ran^+ + OH^-$ $pKb_5 = 9,20$ (Equação 12A)

Nota-se que com a dissociação do ranelato de estrôncio e hidrólise do ânion Ran^{4-} (Eq. 6A a 8A), há uma liberação de OH^- para o meio, aumentando o pH da água. Portanto, para que as demais equações aconteçam, ou seja, para que a espécie em solução $HRan^{-3}$ também sofra hidrólise e assim sucessivamente, seria necessário fornecer ao sistema íons H_3O^+ para que o equilíbrio da Eq. 7A seja deslocado para a esquerda. Como $Kb_5 > Kb_4$ e o pH da solução é constante, assume-se que somente a espécie Ran^{-4} será hidrolisada. Assim, a constante de equilíbrio (K_h – constante de hidrólise) para a Eq. 8A é:

$$K_h = \frac{[HRan^{-3}][OH^-]}{[Ran^{4-}]}$$ (Equação 13A)

$$C\ SrRan = 3,85\% = C\ Ran^{4-} = [Ran^{4-}] + [HRan^{-3}]$$ (Equação 14A)

$$[HRan^{-3}] \approx [OH^-]$$ (Equação 15A)

$$[Ran^{4-}] = C\ Ran^{4-} - [OH^-]$$ (Equação 16A)

$$K_h = K_b \text{ e } K_b = \frac{K_w}{K_a}$$ (Equação 17A)

Substituindo a Eq. 15A e 16A na Eq. 14A, tem-se:

$$K_b = \frac{[OH^-]^2}{C\ Ran^{4-} - [OH^-]}$$

$$[OH^-] = 6,93.10^{-7}\ mol.L^{-1}$$

De acordo com a concentração de OH^- obtida considerando a menor concentração de SrRan (3,85%), o pH da solução é igual a 7,84. Esse valor teórico se encontra bem próximo do valor experimental encontrado para a solução de SrRan empregada (pH igual a 7,27), sugerindo que a consideração de que somente a Eq. 8A acontece, ou seja, que apenas o íon Ran^{-4} é hidrolisado é verdadeira.

O grau de dissociação (α) indica a porcentagem de espécies ionizadas no meio é dado pela razão:

$$\alpha = \frac{\text{número de moléculas ionizadas}}{\text{número de moléculas dissolvidas}} \qquad \text{(Equação 18A)}$$

Assim, o grau de dissociação de cada espécie do ácido ranélico em pH igual a 7,27 e concentração igual a 3,85%, tem-se que:

$$\alpha_0 = \frac{[H_5Ran^+]}{C_t} \qquad \alpha_1 = \frac{[H_4Ran]}{C_t} \qquad \alpha_2 = \frac{[H_3Ran^-]}{C_t} \qquad \alpha_3 = \frac{[H_2Ran^{-2}]}{C_t}$$

$$\alpha_4 = \frac{[HRan^{-3}]}{C_t} \qquad \alpha_5 = \frac{[Ran^{-4}]}{C_t}$$

Ou, também pode ser expresso por:

$$\frac{1}{a_0} = 1 + \frac{Ka1}{[H_3O^+]} + \frac{Ka1.Ka2}{[H_3O^+]^2} + \frac{Ka1.Ka2.Ka3}{[H_3O^+]^3} + \frac{Ka1.Ka2.Ka3.Ka4}{[H_3O^+]^4} + \frac{Ka1.Ka2.Ka3.Ka4.Ka5}{[H_3O^+]^5} \qquad \text{(Eq. 19A)}$$

$$\frac{1}{a_1} = \frac{[H_3O^+]}{Ka1} + 1 + \frac{Ka2}{[H_3O^+]} + \frac{Ka2.Ka3}{[H_3O^+]^2} + \frac{Ka2.Ka3.Ka4}{[H_3O^+]^3} + \frac{Ka2.Ka3.Ka4.Ka5}{[H_3O^+]^4} \qquad \text{(Equação 20A)}$$

$$\frac{1}{a_2} = \frac{[H_3O^+]^2}{Ka1.Ka2} + \frac{[H_3O^+]}{Ka2} + 1 + \frac{Ka3}{[H_3O^+]} + \frac{Ka3.Ka4}{[H_3O^+]^2} + \frac{Ka3.Ka4.Ka5}{[H_3O^+]^3} \qquad \text{(Equação 21A)}$$

$$\frac{1}{a_3} = \frac{[H_3O^+]^3}{Ka1.Ka2.Ka3} + \frac{[H_3O^+]^2}{Ka2.Ka3} + \frac{[H_3O^+]}{Ka3} + 1 + \frac{Ka4}{[H_3O^+]} + \frac{Ka4.Ka5}{[H_3O^+]^2} \qquad \text{(Equação 22A)}$$

$$\frac{1}{a_4} = \frac{[H_3O^+]^4}{Ka1.Ka2.Ka3.Ka4} + \frac{[H_3O^+]^3}{Ka2.Ka3.Ka4} + \frac{[H_3O^+]^2}{Ka3.Ka4} + \frac{[H_3O^+]}{Ka4} + 1 + \frac{Ka5}{[H_3O^+]} \qquad \text{(Equação 23A)}$$

$$\frac{1}{a_5} = \frac{[H_3O^+]^5}{Ka1.Ka2.Ka3.Ka4.Ka5} + \frac{[H_3O^+]^4}{Ka2.Ka3.Ka4.Ka5} + \frac{[H_3O^+]^3}{Ka3.Ka4.Ka5} + \frac{[H_3O^+]^2}{Ka4.Ka5} + \frac{[H_3O^+]}{Ka5} + 1 \qquad \text{(Eq. 24A)}$$

Dessa forma, os valores encontrados para o grau de dissociação de cada espécie do ácido ranélico, segundo as Eq. 19A a 24A foram:

$\alpha_0 = 2{,}78.10^{-20}$ %

$\alpha_1 = 1{,}66.10^{-14}$ %

$\alpha_2 = 3{,}09.10^{-9}$ %

$\alpha_3 = 7{,}24.10^{-5}$ %

$\alpha_4 = 0{,}399$ %

$\alpha_5 = 99{,}6$ %

De acordo com os valores do grau de dissociação, α_5 corresponde a porcentagem de dissociação da última espécie, Ran^{-4}, indicando que no valor de pH empregado, quase 100% do ácido ranélico encontra-se sob a forma do íon Ran^{-4}, corroborando com os cálculos realizados acima.

A Figura 1A mostra o diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o ácido ranélico, indicando que a partir de um pH igual a 6,25, a espécie predominante é o íon Ran^{-4}.

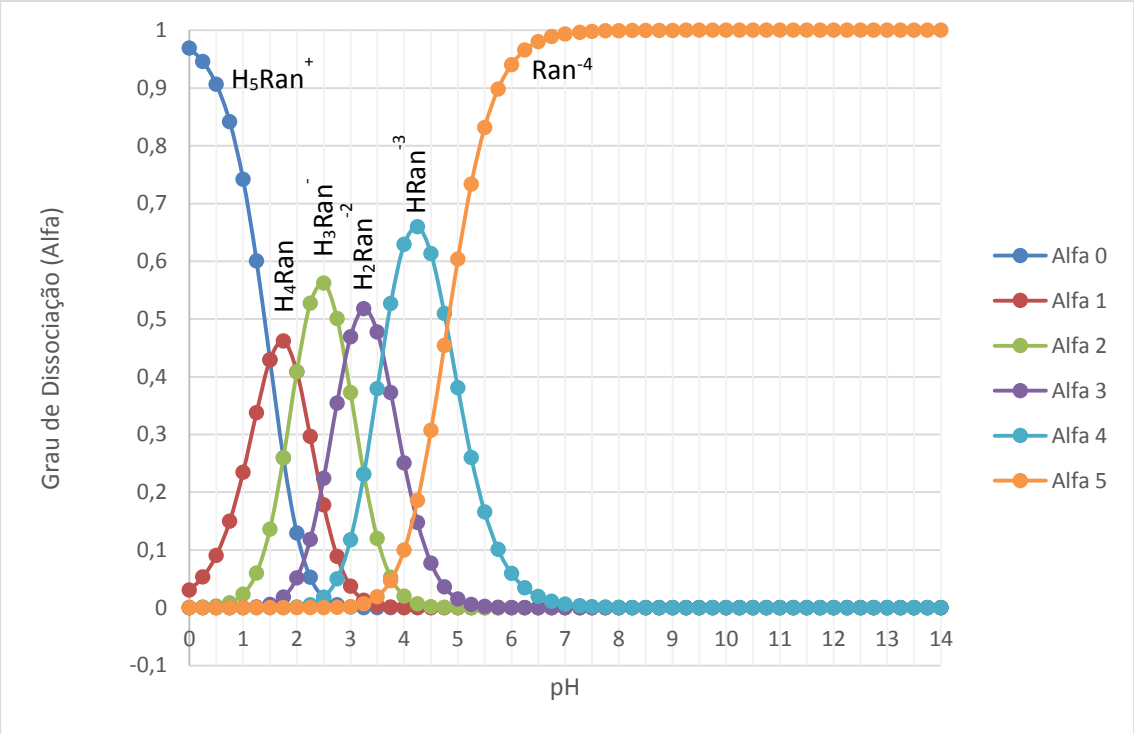


Figura 1A: Diagrama de distribuição das espécies de ácido ranélico.

Considerando a maior concentração de SrRan (38,5%), o pH experimental da solução é igual a 7,75 e o pH teórico calculado seria igual a 8,34. Considerando o grau de dissociação do ácido ranélico para cada espécie no pH 7,75 e concentração igual a 38,5% tem-se:

$\alpha_0 = 1{,}12.10^{-22}$ %

$\alpha_1 = 2{,}0.10^{-16}$ %

$\alpha_2 = 1{,}13.10^{-10}$ %

$\alpha_3 = 7{,}98.10^{-6}$ %

$\alpha_4 = 0{,}112$ %

$\alpha_5 = 99{,}8$ %

Essa elevada dissociação do ácido ranélico reforça a hipótese de que durante o processo de produção das microesferas empregando o fármaco SrRan, o íon estrôncio é incorporado pelo processo de adsorção. Porém, como somente uma fração do SrRan é solúvel, uma pequena quantidade de estrôncio estaria disponível em solução para participar do processo de gelificação.

A diferença de valores encontrados para a concentração de estrôncio incorporada considerando a técnica de UV-Vis e a EAA pode ser explicada levando-se em consideração a presença do íon Ran^{-4}. O UV-Vis faz a leitura da molécula orgânica, o ácido ranélico, que por estequiometria, chega-se ao estrôncio (1 mol ácido ranélico equivalem a dois mols de estrôncio). Assim, como em solução é o íon Ran^{-4} que está presente, parte dele poderia estar adsorvida na superfície das microesferas na forma de Ran^{4-}. Esse ânion se ligaria aos sítios positivos encontrados na superfície das microesferas, refletindo o valor superestimado da concentração de estrôncio.