UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

PASCALLY MARIA APARECIDA GUERRA DE ARAÚJO

PREPARAÇÃO DE COMPÓSITOS HÍBRIDOS PARA APLICAÇÃO COMO CARREADORES DE FÁRMACO NO TRATAMENTO DA OSTEOMIELITE

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa Co-orientadora: Dr.^a Sheyla Maria de Castro Máximo Bicalho

> Campina Grande – PB 2017

Pascally Maria Aparecida Guerra de Araújo

PREPARAÇÃO DE COMPÓSITOS HÍBRIDOS PARA APLICAÇÃO COMO CARREADORES DE FÁRMACO NO TRATAMENTO DA OSTEOMIELITE.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito final à obtenção do título de **Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa **Co-orientadora:** Dr.^a Sheyla Maria de Castro Máximo Bicalho

Agência Financiadora: CAPES Empresa colaboradora: JHS Biomateriais

> Campina Grande – PB 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG



CURRÍCULO VITAE

- Graduada em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual da Paraíba (2009).
- Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela UFCG (2012).

PASCALLY MARIA APARECIDA GUERRA DE ARAÚJO

PREPARAÇÃO DE COMPÓSITOS HÍBRIDOS PARA APLICAÇÃO COMO CARREADOR DE FÁRMACO NO TRATAMENTO DA OSTEOMIELITE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Aprovado em: 22/02/2017

Dr.^a Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa Orientadora UAEMa/PPG-CEMat/UFCG

> Dr. Francisco Vieira de Oliveira Examinador Externo UAM/UFCG

Dr.^a Líbia de Souza Conrado Oliveira Examinadora Externa UAEQ/ UFCG

Junior i

Dr.^a Normanda Lino de Freitas Examinadora Interna UATEC/UFCG

Folyanc

Dr.^a Polyana Tarciana Araujo dos Santos Examinadora Externa PDJ/CNPQ/UFCG

Alguns homens vêem as coisas como são e dizem "por quê" Eu sonho com coisas que não existem e digo "Por que não" Bernard Shaw.

AGRADECIMENTOS

O Doutorado, é o passo onde consolido e intensifico meu aprendizado e conhecimento dentro do meu campo de estudos, tornando-me assim, uma pesquisadora. Tarefa nada fácil, para uma pessoa de origem simples, a qual, passou pelas mais diversas provações para chegar aqui. História de vida que poderia ser descrita em outra tese.

Por isso, como disse Ayrton Senna "Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas". Sendo assim, eu não teria chegado até aqui sem o apoio, amizade, carinho, compreensão de cada um de vocês. Por isso, agradeço de forma suscinta:

À Deus, o autor da vida, pela graça de mais uma etapa vencida. A ele, toda honra e toda glória. Essa vitória, é obra de tuas mãos, Senhor!

Aos meus pais, Manoel e Livramento e meus irmãos: Janduy, Jânio, Jan, João Paulo, NKarthe, Kamilla e Maria José. Às minhas cunhadas (Tuilly, Kátia, Suelene e Camilla), cunhados, (Claúdio e Bruno), sobrinhos (Pedro, Lucas, Lhayse, Gabriel, Samuel e os dois que estão sendo gerados), tios, avó (Josefa Dionísia Leal *in memoriam*), afilhados, padrinho, madrinhas, primos, família em geral (porto seguro).

À professora Dr.^a Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa, pela orientação deste trabalho e por tantas vezes, assumir muito mais que o papel de orientadora, uma mãe, amiga, conselheira, pela paciência, amor, compreensão, e, sobretudo pela dedicação em todas as fases desta pesquisa, a minha admiração. À minha coorientadora, e diretora da JHS Biomateriais Dr.^a Sheyla Maria de Castro Máximo Bicalho pelo apoio.

Ao grupo de biomateriais do LabSMaC, amigos queridos Dr.^a Polyana Araújo; Raquel Leite; Geceane Dias; Dr. Fábio Gondim Nepomuceno; Hudson Araújo; Ray Araújo, Itálo Lima os quais, acompanharam de forma mais próxima os momentos de "dor" e de glória! motivaram, incentivaram, ajudaram na execução dessa tese. Pessoas estas, que ocupam um lugar especial no meu coração.

À banca, nas pessoas dos queridos amigos e professores: Dr.^a Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa; Dr.^a Polyana Tarciana Araújo dos Santos; Dr.^a Normanda Lino de Freitas; Dr.^a Líbia de Sousa Conrado Oliveira; Dr. Francisco Vieira de Oliveira que contribuíram para aperfeiçoar e abrilhantar essa tese. Meu muito obrigada, pelas valiosas contribuições.

Ao médico ortopedista, e amigo Dr. Fábio Gondim Nepomuceno, pelas valiosas contribuições, pelo conhecimento compartilhado, pela disponibilidade sobretudo na fase final dessa pesquisa e em outras pesquisas que pretende-se desenvolver posteriormente em trabalhos futuros.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG, com a supervisão da professora/pesquisadora Dr.ª Andrea Pacheco Borges onde pretende-se dar sequência na realização dos estudos *in vivo*.

Ao Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) onde foram feitos os ensaios de DRX, horiba e análise textural, aos operadores e amigos muito obrigada, pela disponibilidade em fazer as caracterizações.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB, da unidade acadêmica de

Engenharia Química (LEQ), da UFCG, com a supervisão da professora/pesquisadora Dr.ª Libia Conrado e aos amigos Isabela Alves, Samuel Brito, Albaniza Alves pelos ensaios de liberação de fármaco.

Aos meus amigos, funcionários e todos que fazem o LabSMaC, pelo apoio, amizade, incentivo.

À professora Dr.^a Ruth Herta G. Aliaga Kiminami pelas análises de MEV realizados no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do DEMA/UFSCar.

À Daniela da Costa Barbosa e a Prof. Dr.ª Simoni Margarete Plentz Meneghetti pelos ensaios de FTIR realizados no Instituto de Química e Biotecnológia (IQB) da UFAL.

Ao professor Dr. Manoel Ribeiro da Silva; Instituto de Física e Química da Universidade federal de Itajubá pelos ensaios de medida magnética.

Ao Hospital Municipal de Boqueirão pelo fornecimento do fármaco cloridrato de ciprofloxacino (ciproflonax) utilizado nessa tese.

Ao Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários da UNIFESP na pessoa da professora/pesquisadora Dr.ª Patricia Lopes e de forma especial aos amigos (Fúlvio corazza, Raquel Bertoluci, Gabriela gomes, Julia vaz) e demais integrantes do grupo, onde foram feitos os ensaios *in vitro*, pelo apoio, amizade, pela receptividade, paciência e disponibilidade. Que Deus, os abençoe sempre mais!

Ao IPEN, na pessoa do pesquisador e amigo Dr. Gustavo Varca, pelo apoio.

Aos meus professores, aqueles que fizeram parte de minha vida, desde meus cinco anos de idade, aos quais partilharam comigo, tantos sonhos, dificuldades e sempre me incentivaram e motivaram a seguir.

Aos amigos, alunos, professores e funcionários da Escola Estadual Conselheiro José Braz do Rêgo, pela amizade, carinho, companheirismo.

Aos amigos, Dr. Lucius Vinicius Machado e a secretária do LabSMaC Ana Izabel, pelo apoio, atenção, carinho e amizade.

À Dr.^a Verônica Cristina Diniz; Ms. Raquel Leite Dr.^a joelda Dantas, Dr.^a Elvia, Dr.^a Patricia Tatiana, Dr.^a Daniella Cibelle, Ms. Francisco Nilson, Ms. Adriano, Dr.^a Izabelle Albuquerque, Dr.^a Ana Flávia, Dr. Alex, Dr. Kleberson, Dr.^a Patricia Costa, minha gratidão pelos momentos partilhados e vividos dentro e fora do LabSMaC.

À médica e amiga, Dr.^a Gesira Soares de Assis Florentino, que está presente em minha vida sendo médica, conselheira e amiga no tratamento de hepatite auto imune, doença que me faz superar meus limites diariamente.

Ao programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPG-CEMat) na pessoa do professor Dr. Romualdo Menezes pela oportunidade a mim conferida de fazer minha pós graduação em um curso extremamente conceituado, dando apoio e incentivo à pesquisa, a todo os professores do DEMA da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), pelo aprendizado, crescimento pessoal e profissional, e aos secretários André e Marcia pelos profissionais altamente capacitados, por serem tão atenciosos e solícitos.

Aos órgãos de fomento CAPES, pelo apoio financeiro e a empresa colaboradora JHS Biomateriais.

À todos, que contribuíram de uma forma ou de outra, para execução desta pesquisa de tese.

RESUMO

Nesta pesquisa, propomos, obter e caracterizar de forma inédita compósitos híbridos (novos carreadores de fármaco) a base da hidroxiapatita e nanoparticulas magnéticas associadas ao tetraetilortosilicato (TEOS) e ao agente silano tipo 3aminopropiltrimetoxisilano (APTS) conjugado ao fármaco ciproflonax visando avaliar sua aplicação no tratamento da osteomielite. Numa primeira etapa, os materiais individuais foram sintetizados. Na segunda etapa, foram obtidos em diferentes concentrações, os híbridos e compósitos híbridos. Os materiais precursores e os carreadores obtidos nas etapas I e II foram caracterizados por técnicas de análise estrutural, morfológica e magnética visando o entendimento das propriedades na formação do carreador de fármaço. Os resultados das etapas I e II indicaram que foram obtidas com sucesso as nanopartículas magnéticas (NPM's) da Fe₃O₄ por reação de combustão em forno microondas e da CoFe₂O₄ por reação de combustão em escala em escala piloto; a hidroxiapatita (HAp) monofásica obtida pelo método de precipitação e híbridos NPM's@SiO2 (core-shell). Na etapa II obteve-se com sucesso os compósitos híbridos (carreadores de fármaco magnéticos) a base das NPM's híbridas e da HAp comercial da JHS Biomateriais e sintetizada no laboratório, com característica cristalina e nanoestrutural. Em que, tanto os precursores obtidos na etapa I quanto os compósitos híbridos apresentaram propriedades estrututurais, morfológicas e magnéticas promissoras para uso como carreador de fármaco especificamente no tratamento da osteomielite. Na etapa III foram realizados os ensaios in vitro de citotoxidade para os precursores e compósitos híbridos obtidos e testes de liberação de fármaco para os compósitos híbridos (carreadores). Por meio dos resultados obtidos, observou-se que, as NPM's de Fe_3O_4 , CoFe₂O₄ dos híbridos Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ e da hidroxiapatita (HAp) sintetizada no LaBSmaC apresentaram viabilidade celular superior a 70% e que, o revestimento das NPM's de Fe₃O₄, CoFe₂O₄ e obtenção dos híbridos aumentaram ainda mais a viabilidade celular e biocompatibidade das NPM's magnéticas como carreadores do fármaco ciprofloxacino. A biocompatibilidade dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco) e do solvente PVA usado para dispersão dos carreadores foram avaliados em diversas concentrações, via estudos *in vitro* (citotoxidade). Observou-se por meio do perfil citótoxico que, a concentração segura, na qual a viabilidade celular foi superior a 70 % foi de 0,312 mg/mL para os compósitos híbridos (carreadores) HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 , HCoFS γ_1 , HJCoFS γ_1 , F γ , e de 0,156 mg/mL para o compósito HCoFS₇₁. Os testes de liberação de fármaco para os compósitos híbridos (carreadores) confirmaram que, tanto os carreadores obtidos com Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ apresentaram alta eficiência na conjugação e liberação do fármaço ciprofloxacino. Entretanto, os compósitos híbridos sintetizados com a CoFe₂O₄ e a HAp comercial da JHS Biomateriais apresentaram liberação mais rápida, quando comparado aos compósito híbridos formados com a Fe₃O₄ e HAp sintetizada no laboratório. Todas estas características permitiram auxiliar no entendimento das propriedades dos materiais em estudo para que estes sejam otimizados com eficiência para o desenvolvimento de um produto tecnológico, eficiente para aplicação no tratamento da osteomielite.

Palavras-Chave: hidroxiapatita, nanopartículas magnéticas, carreadores de fármaco, ciprofloxacino, osteomielite.

ABSTRACT

In this research, we propose, obtain and characterize in an unprecedented way hybrid compounds (new drug carriers) the base on hydroxyapatite and nanoparticles associated with tetraethylorthosilicate (TEOS) and the silane agent type 3aminopropyltrimethoxysilane (APTS) conjugated to the drug ciproflonax and evaluate the effect of treatment osteomyelitis. In a first step, the individual materials synthesized were. In the second stage, hybrids and hybrid composites obtained were in different concentrations. The precursor materials and carriers obtained in steps I and II characterized were by structural, morphological and magnetic analysis techniques aiming at understanding the properties in the formation of the drug delivery. The results of steps I and II indicated that the Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (NPM's) were successfully obtained by microwave oven and CoFe₂O₄ combustion reaction in a pilot scale scale reaction; The monophasic hydroxyapatite (HAp) obtained by the precipitation method and NPM's@SiO₂ hybrids (core-shell). In step II the hybrid composites (magnetic drug delivery) were the base of the hybrid NPMs and the commercial HAp of JHS Biomaterials and synthesized in the laboratory, with crystalline and nanostructural characteristics. In that both the precursors obtained in step I and the hybrid composites showed promising structural, morphological and magnetic properties for use as a drug delivery specifically in the treatment of osteomyelitis. In stage III the in vitro cytotoxicity assays were performed for the hybrid precursors and composites obtained and drug release tests for the hybrid composites (carriers). The Fe₃O₄, CoFe₂O₄ NPM's of the Fe₃O₄@SiO₂ and CoFe₂O₄ @SiO₂ hybrids and the hydroxyapatite (HAp) synthesized in LaBSmaC were shown to have cell viability greater than 70% and that the NPM's coating of Fe₃O₄, CoFe₂O₄ and hybrid uptake have further increased cell viability and biocompatibility of magnetic NPM's as carriers of the drug ciprofloxacin. The biocompatibility of the hybrid composites (drug delivery) and of the PVA solvent used for carrier dispersion evaluated were at various concentrations via in vitro (cytotoxicity) studies. It observed was by the cytotoxic profile that the safe concentration, in which the cell viability was higher than 70%, was 0.312 mg/mL for the hybrid composites (carriers) HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 , HCoFS γ_1 , HJCoFS γ_1 , F γ , e de 0,156 mg/mL para o compósito HCoFS₇₁ composite. Drug release tests, for the hybrid (carrier) composites confirmed that, both $Fe_3O_4@SiO_2$ and $CoFe_2O_4@SiO_2$ carriers presented high efficiency in the conjugation and release of the drug ciprofloxacin. However, the hybrid composites synthesized with CoFe₂O₄ and the commercial HAp from JHS Biomaterials, presented faster release when compared to hybrid composites formed with Fe₃O₄ and HAp synthesized in the laboratory. All these characteristics allowed helping in the understanding of the properties of the studied materials for that these are optimized efficiently for the development of a technological product, efficient for application in the treatment of osteomyelitis.

Keywords: hydroxyapatite, magnetic nanoparticles, drug delivery, ciprofloxacin, osteomyelitis

PUBLICAÇÕES

- <u>ARAÚJO, P.M.A.G.</u>; SANTOS, P.T.A.; BICALHO, S. M. C. M.; BICALHO, D. M.; SILVA, M. R.; COSTA, A. C. F. M. Compósito híbrido de Fe₃O₄@SiO₂/hidroxiapatita/ciproflonax para aplicação como carreador de fármaco no tratamento da osteomielite. In: 4ª Edição do Workshop de Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais, Campina Grande, 2015.
- <u>ARAÚJO, P. M. A. G.</u>; BICALHO, S. M. C. M.; BICALHO, D. M.; SILVA, M. R.; COSTA, A. C. F. M. Estudo das propriedades estruturais e morfológicas do fármaco ciproflonax para aplicação no tratamento da osteomielite. In: 4ª Edição do Workshop de Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais, Campina Grande, 2015.
- <u>ARAÚJO, P. M. A. G.</u>; SANTOS, P.T.A.; CORNEJO, D.R.; COSTA, A. C. F. M. Influência dos precursores na sintese por reação de combustão da Fe₃O₄ em atmosfera inerte de N₂ em forno micro-ondas. In: VII Encontro Técnico de Materiais e Química, Rio de Janeiro, 2015.
- SANTOS, I. A.; F.; <u>ARAUJO, P. M. A. G</u>.; COSTA, A. C. F. M.; CONRADO, L. S. Avaliação do efeito da hidroxiapatita na liberação do fármaco Ciproflonax em nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄. In: Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2016, Foz do Iguaçu. 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2016.
- <u>ARAUJO, P. M. A. G.</u>; SANTOS, I. A.; F.; LIMA, A. S.; CONRADO, L. S.; COSTA, A. C. F. M. Estudo da liberação do Ciproflonax em híbridos de Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂. In: Encontro Brasileiro sobre Adsorção, 2016, Aracajú. 11º Encontro Brasileiro sobre Adsorção, 2016.
- <u>ARAUJO, P. M. A. G</u>; ARAÚJO, N. G.; SILVA, M. R.; BICALHO, S. M. C. M. COSTA, A. C. F. M. Study of the effect of surface modification of Fe₃O₄ and CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles for application as a drug delivery in the treatment of osteomyelitis, Manuscript id CE: 2017-0005, Journal Cerâmica, Submetido.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Organossilanos não reativos. 37
Tabela 2 - Silanos aminofuncionais
Tabela 3 - Organossilanos reativos adicionais. 38
Tabela 4 - Tipos de fosfatos de cálcio que variam em fórmulas químicas e valores de
solubilidade
Tabela 5 - Parâmetros de síntese da HAp por precipitação60
Tabela 6 - Carreadores de fármaco para liberação no local. 64
Tabela 7 - Perfil de dessorção de antibióticos em carreadores de fármaco usados no
tratamento da osteomielite73
Tabela 8 - Antibiótico comum usado para terapia sistêmica da osteomielite e seu
perfil cinético (Cmax indica tempo na concentração sérica máxima, t1/2 representa
meia vida e Vd denota o volume de distribuição)75
Tabela 9 - Códigos das amostras e composições
Tabela 10 - Formulações e códigos dos compósitos híbridos (carreadores de
fármaco)
Tabela 11 - Formulações e códigos dos compósitos híbridos
Tabela 12 - Formulações e códigos dos compósitos híbridos (carreadores de
fármaco)
Tabela 13 - Cristalinidade, tamanho de cristalito para pico de maior intensidade (311)
para as NPM's de CoFe ₂ O ₄ (CoF) e de Fe ₃ O ₄ (FeF), revestidas com o TEOS e com
o TEOS e APTS
Tabela 14 - Cristalinidade, tamanho de cristalito para as amostras em estudo108
Tabela 15 - Número de onda e banda de absorção para a hidroxiapatita sintetizada
(HL), para a hidroxiapatita comercial (HJHS) e hidroxiapatita calcinada (HLC)114
Tabela 16 - Número de onda e bandas de absorção referente ao fármaco (y)
ciproflonax117
Tabela 17 - Valores de área superficial específica (SBET), tamanho de partícula
(D _{BET}), volume de poro (Vp) e diâmetro de poro (Dp) das amostras em estudo118
Tabela 18 - Diâmetros das partículas das amostras de acordo com os índices de
distribuição123
Tabela 19 - Parâmetros magnéticos referentes para as amostras em estudo antes e
após revestimento com o TEOS e o TEOS e APTS simultaneamente

Tabela 20 - Cristalinidade, tamanho de cristalito em relação ao pico de maior intensidade (311) para os híbridos CoFe₂O₄@SiO₂ (C γ) e Fe₃O₄@SiO₂ (F γ); HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ (HC), HAp:Fe₃O₄@SiO₂ (HF) e dos compósitos híbridos HJCoFS₇₁; HCoFS₇₂ e HCoFS₇₃ e HJFeFS₇₁, HFeFS₇₁, HFeFS₇₂ e HFeFS_{γ3.}.....139 Tabela 21 - Número de onda e bandas de absorção referente aos híbridos Tabela 22 - Número de onda e bandas de absorção referente aos HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ (HC), HAp:Fe₃O₄@SiO₂ (HF).....142 Tabela 23 - Número de onda e bandas de absorção referente aos compósitos híbridos HJCoFS₇₁; HCoFS₇₁; HCoFS₇₂ e HCoFS₇₃ e HJFeFS₇₁, HFeFS₇₂ e HFeFS_{γ3}......144 Tabela 24 - Valores de área superficial específica (SBET), tamanho de partícula (DBET), volume de poro (Vp) e diâmetro de poro (Dp) das amostras em estudo. 145 Tabela 25 - Diâmetros das partículas das amostras de acordo com os índices de distribuição......148 Tabela 26 - Parâmetros magnéticos referentes para para os híbridos C γ e F γ ; Para os compósitos híbridos HC, HF; HJCoFSy1; HCoFSy1; HCoFSy2 e HCoFSy3 e HJFeFSγ₁, HFeFSγ₂ e HFeFSγ₃.....156 Tabela 27 - Valores de viabilidade celular e do desvio padrão das substâncias de Tabela 28 - Valores de viabilidade celular e do desvio padrão das substâncias de referência (CN – PEAD e CP – Látex natural) e das NPM's de de CoFe₂O₄ (CoF) e dos híbridos CoFe₂O₄@SiO₂ (CoFS)......159 Tabela 29 - Valores de viabilidade celular e do desvio padrão das substâncias de referência (CN – PEAD e CP – Látex natural) e das NPM's de de Fe₃O₄ (FeF), e do Tabela 30 - Valores referentes a IC50 (concentração que mata 50% das células) e referentes a IC10 (concentração que mata 10% das células) e DL50 (a concentração que mata 50 % dos animais)......168 Tabela 31 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta

Tabela 32 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta
nos compósitos híbridos HFeFSγ1, HFeFSγ2 e HFeFSγ3174
Tabela 33 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta
das amostras HCoFSγ ₁ , HCoFSγ ₂ , HCoFSγ ₃ 175
Tabela 34 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta
das amostras JHFeFSγ1 e JHCoFSγ1177
Tabela 35 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta
do compósito HFeFSγ2'179
Tabela 36 - Perfil de dessorção do antibiótico ciprofloxacino (ciproflonax) nos
carreadores de fármaco usados no tratamento da osteomielite

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Moléculas orgânicas (~) imobilizadas numa rede inorgânica (+++)
preparada via sol-gel, a partir de precursores inorgânicos (+) (José e Prado, 2005).
Figura 2 - Monômeros orgânicos (
seguida da polimerização, gerando o correspondente polímero (>>>>) (José e Prado,
2005)
Figura 3 - Formação simultânea de duas redes a partir de monômeros orgânicos
(AA) e precursores inorgânicos (+) (José e Prado, 2005)32
Figura 4 - Material híbrido orgânico-inorgânico com ligações covalentes entre as
fases (José e Prado, 2005)
Figura 5 - Material híbrido orgânico-inorgânico formado por ligações covalentes
apresentando pontes de hidrogênio (José e Prado, 2005)
Figura 6 - Modificação de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ com o TEOS e APTS (3-
aminopropiltrimetoxisilano
Figura 7 - Ligação do silano com a superfície de uma fibra (Dibenedetto, 2001)36
Figura 8 - formação da sílica através das reações de hidrolise e condensação do
TEOS (Adaptado de Lin <i>et al.</i> , 2013)
Figura 9 - As nanopartículas magnéticas possuindo vários ligantes, para permitir a
multifuncionalidade a partir de um único centro de nanopartículas (Adaptado de
Kango <i>et al.</i> , 2013)40
Figura 10 - Dispersibilidade de nanopartículas magnéticas em diferentes solventes
(Kanimozhi e Perinbam, 2013)42
Figura 11 - Histograma de publicações das NPM's como carreador de fármaco no
período de 2011 à 201743
Figura 12 - Histograma de sistemas de NPM's mais usadas como carreador de
fármaco no período de 2011 a 201744
Figura 13 - Esquema ilustrativo da célula unitária do espinélio. (a) sítio tetraédrico
(Sítio -A); (b) sítio octaédrico (Sítio -B); (c) célula unitária da estrutura de espinélio e
(d) ampliação de 2/8 da célula unitária para melhor visualizar a disposição dos
cátions e do aníon nos sítios A e B (Adaptada de Junior et al., 2009)46
Figura 14 - Vista em perspectiva ao longo do eixo c do ambiente do local onde estão
os íons OH ⁻ . Alguns dos ions de substituição possíveis são relatados. Os dois

triângulos juntam os íons Ca (II) no mesmo nível ao longo do eixo c (Bigi, Boanini e Figura 16 - Ilustração de um carreador de fármaco magnético para o tratamento da osteomielite (Adaptado de Falqueiro, 2011).....63 Figura 17 - três categorias de osteomielite (A e B) A disseminação hematogênica primária (transmitida pelo sangue). (C e D) A infecção óssea contigua é mais comumente vista com contaminação direta de bactérias em fraturas abertas ou cirurgia de substituição articular com implantes protéticos. (E) A osteomielite associada à doença vascular ou neurológica afeta mais frequentemente a extremidade inferior......67 Figura 18 - O córtex medial do maléolo (parte distal da tíbia) revela a presença de 2 defeitos líticos corticais (Hwang et al., 2017).68 Figura 19 - Aparência histopatológica de osso sugerindo osteomielite supurativa aguda. (A) Perda de trabéculas espongosas típicas e coleções embaladas de células inflamatórias na medula (hematoxilina e mancha de eosina [H & E], ampliação original × 100). (B) Infiltrações densas de neutrófilos e trabéculas irregulares destruídas irregularmente (hematoxilina e mancha de eosina [H & E], ampliação original × 400) (Hwang *et al.*, (2017).....69 Figura 20 - Tomografia computadorizada de uma mandíbula (corte axial), com presença de osteomielite de origem bacteriana (Suei *et al.*, 2005)......70 Figura 21 - Radiografias do joelho: as setas apontam para uma lesão lítica na tíbia típica superior (A) a ressonância magnética ponderada em T1 com contraste mostra a área de osteomielite (B) (Calhoun et al., 2005).....71 Figura 22 - Fórmula estrutural do fármaco cloridrato de ciprofloxacino (The Merck Index, 2006)......74 Figura 23 - Cadinho de sílica vítrea (a), esquema detalhado do reator de microondas (b).....79 Figura 24 - Fluxograma do processo de síntese das NPM's de Fe₃O₄.....80 Figura 25 - Recipiente e reator utilizado para a obtenção das NPM's de CoFe₂O₄ por reação de combustão......81 Figura 26 - Fluxograma do processo de síntese das NPM's de CoFe₂O₄......81 Figura 27 - Fluxograma da obtenção da HAp de laboratório e HAp calcinada.......83 Figura 28 - Hidroxiapatita comercial da JHS Biomateriais (jhs.med.br/, 2017).84

Figura 29 - Fluxograma da obtenção das NPM's híbridas (NPM's@SiO₂)......85 Figura 30 - Fluxograma da obtenção dos compósitos híbridos HAp:NPM's@SiO₂:γ 87 Figura 31 - Fluxograma de obtenção dos compósitos híbridos HAp:NPM's@SiO2:y Figura 32 - Fluxograma da obtenção dos compósitos híbridos HC e HF.90 Figura 33 - Fluxograma da obtenção dos compósitos híbridos C γ e F γ91 Figura 34 - Esquema da disposição das células na placa de 96 poços. B = controle da solução; VC = controle da viabilidade celular; C1-C8 = diluições da amostra em ordem crescente de concentração (mg/mL)......99 Figura 35 - Separação da fase sólida da líquida coletada para a análise de absorbância......100 Figura 36 - Sistema descontínuo de liberação do fármaco. Figura 37 - DRX (a) padrão da CoFe₂O₄ e da Fe₂O₃, e DRX das amostras CoF, CoFT e CoFS; (b) padrão da Fe₃O₄ e da Fe₂O₃, e DRX das amostras FeF, FeFT e Figura 39 - Estrutura óssea que apresenta a composição do osso em diferentes escalas de tamanho (Cunha, 2010).108 Figura 40 - FTIR: (a) amostras CoF, CoFT e CoFS e (b) amostras FeF, FeFT e Figura 41 - FTIR das amostras de HAp comercial (HJHS), HAp sintetizada no Figura 42 - (a) Espectro de FTIR para o fármaco (y) cloridrato de ciprofloxacino na faixa de 4000 – 500 cm⁻¹ e (b) ampliação do espectro na faixa de 1500-650 cm⁻¹..116 Figura 43 - Distribuição granulométrica das amostras: (a) CoF, (b) CoFT e (c) CoFS Figura 44 - Distribuição granulométrica das amostras: (a) FeF, (b) FeFT e (c) FeFS Figura 45 - Distribuição granulométrica das amostras: (a) HJHS, (b) HL, (c) HLC, (d) γ.....122 Figura 46 - MEV das amostras: (a) CoF, (b) CoFT e (c) CoFS.

Figura 49 - Curvas de histerese para: (a) CoF, CoFT, CoFS (b) FeF, FeFT e FeFS, Figura 50 - DRX (a) padrão da CoFe₂O₄, da Fe₂O₃ e da e da Fe₂O₃ e DRX da amostra (Cy); (b) padrão da Fe₃O₄ e da Fe₂O₃, e DRX da amostra (Fy)......134 Figura 51 - DRX (a) padrão da HAp, da CoFe₂O₄, Fe₂O₃ e DRX da amostra (HC); (b) padrão da HAp, Fe₃O₄ e da Fe₂O₃, e DRX da amostra (HF)......136 Figura 52 - DRX (a) padrão da HAp, da CoFe₂O₄, Fe₂O₃ e DRX dos compósitos híbridos HJCoFS₇₁; HCoFS₇₁; HCoFS₇₂ e HCoFS₇₃; (b) padrão da HAp, Fe₃O₄ e da Fe₂O₃, e DRX dos compósitos híbridos HJFeFS₇₁, HFeFS₇₁, HFeFS₇₂ e HFeFS₇₃. Figura 53 - FTIR dos híbridos CoFe₂O₄@SiO₂: γ (C γ) e Fe₃O₄@SiO₂: γ (F γ)......140 Figura 54 - FTIR dos compósitos híbridos HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ (HC), HAp:Fe₃O₄@SiO₂ (HF)......142 Figura 55 - FTIR dos compósitos híbridos HJCoFS₇₁; HCoFS₇₁; HCoFS₇₂ e HCoFS₇₃ Figura 56 - Distribuição granulométrica dos híbridos: (a) C_{γ} (b) F_{γ}146 Figura 57 - Distribuição granulométrica dos compósitos híbridos: (a) HC (b) HF....146 Figura 58 - Distribuição granulométrica dos compósitos híbridos: HJCoFS₉₁; HCoFSγ₁; HCoFSγ₂ e HCoFSγ₃......147 Figura 59 - Distribuição granulométrica dos compósitos híbridos: HJFeFS_{γ1}, HFeFSγ₁, HFeFSγ₂ e HFeFSγ₃.....148 Figura 61 - MEV dos compósitos híbridos: (a) HC (b) HF. Figura 62 - MEV dos compósitos híbridos: HJCoFSy1; HCoFSy2 e HCoFS_{γ3}......151 Figura 63 - MEV dos compósitos híbridos: (a) HJFeFS₉₁, (b) HFeFS₉₁, (c) HFeFS₉₂ e (d) HFeFS_{γ3}......152 Figura 66 - Curvas de histerese dos compósitos híbridos: HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ;

Figura 67 - Curvas de histerese dos compósitos híbridos: HJFeFS ₇₁ , HFeFS ₇₁ ,
HFeFSγ2 e HFeFSγ3155
Figura 68 – viabilidade celular obtidos do extrato 100% das substâncias de
referência (CN – PEAD e CP – Látex natural) e hidroxiapatita
Figura 69 - Viabilidade celular e desvio padrão das substâncias de referência (CN -
PEAD e CP - Látex natural) e das NPM's de CoFe2O4 (CoF) e do híbridos
CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ (CoFS)159
Figura 70 - Viabilidade celular e do desvio padrão das substâncias de referência (CN
- PEAD e CP - Látex natural) e das NPM's de de Fe ₃ O ₄ (FeF), e do híbrido
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ (FeFs)160
Figura 71 - Avaliação da citotoxicidade do solvente161
Figura 72 - Avaliação da citotoxicidade das amostras HFeFS _{γ1} 162
Figura 73 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HFeFS _{γ2} 163
Figura 74 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HFeFS _{γ3.} 163
Figura 75 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HJFeFSγ1164
Figura 76 - Avaliação da citotoxicidade das amostras Fγ164
Figura 77 - Avaliação da citotoxicidade da amostra C γ 165
Figura 78 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HF165
Figura 79 - Avaliação da citotoxicidade das amostras HCoFSγ2166
Figura 80 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HCoFSγ3166
Figura 81 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HJCoFSγ1167
Figura 82 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HCoFSγ1
Figura 83 - Placas com o corante neutral red169
Figura 84 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciproflonax adsorvido nos
compósitos híbridos Cγ e Fγ171
Figura 85 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciproflonax adsorvido nos
compósitos híbridos HFeFSγ1, HFeFSγ2 e HFeFSγ3173
Figura 86 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciproflonax adsorvido nos
compósitos híbridos HCoFSγ1, HCoFSγ2, HCoFSγ3
Figura 87 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax) no
compósito híbrido JHFeFSγ1176
Figura 88 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax) no
compósito híbrido JHCoFSγ1177

Figura	89	-	Perfil	cinético	da	liberação	do	fármaco	ciproflonax	adsorvido	no
compó	sito	híb	orido H	FeFSγ2'						······	179

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AB2O4 estrutura do tipo espinélio normal
- ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas
- AGM magnetômetro de gradiente alternado
- APTES 3-aminopropiltrietoxissilano
- APTS 3-aminopropiltrimetoxisilano
- CoFe₂O₄ ferrita de cobalto
- core-shell- casca-núcleo
- DBET diâmetro médio equivalente (nm)
- DDS sistema de administração de fármaco
- DG Distribuição Granulométrica
- DNA ácido desoxirribonucleico
- DOX doxorrubicina
- Dp diâmetro do poro
- DRX Difração de raios X
- EDX Espectroscopia de fluorescência de raios X
- EtOH álcool etílico
- Fe₂O₃ hematita
- Fe₃O₄ ou FeFe₂O₄ -magnetita
- FTIR Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourrier
- H₃PO₄ ácido fosfórico
- HAp hidroxiapatita
- Hc Campo coercivo
- JCPDF Joint Committee on Powder Diffraction Files
- LabSMaC Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos
- m/m proporção em massa
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
- Mr- magnetização remanescente
- Ms magnetização de saturação
- NPM's nanopartículas magnéticas
- NPM's@SiO₂ híbrido nanopartículas magnéticas revestidas com a sílica
- NPM's@SiO₂:HAp compósito híbrido nanopartículas magnéticas revestidas com a sílica e hidroxiapatita

NPM's@SiO2:HAp/y - compósito híbrido nanopartículas magnéticas revestidas com a

- sílica e hidroxiapatita conjugado com o fármaco
- PBS tampão fosfato-salino
- PDMS poli dimetoxisiloxano
- pH potencial hidrogeniônico
- PLGA poli (L-ácido lático-co-ácido glicólico)
- RES sistema do reticulo endotelial
- Rpm rotações por minuto
- SBET área superficial específica
- SiO₂- sílica
- Tc tamanho de cristalito
- TEOS tetraetilortosilicato
- UAEMa Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais
- UFCG Universidade Federal de Campina Grande
- UFScar Universidade Federal de São Carlos
- UNIFEI- Universidade Federal de Itajubá
- UNIFESP Universidade Federal de São Paulo
- V_p volume do poro
- VSM magnetômetria de amostra vibrante
- ρ densidade teórica (g/cm³)
- ρ_{Exp} densidade experimental (g/cm³)
- γ- fármaco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	
2.1 Materiais Híbridos	
2.2 Modificação de Superfície33	
2.3 Nanopartículas Magnéticas (NPM's)40	
2.4 Ferroespinélio FeFe2O4 e CoFe2O445	
2.5 Ferrita de Cobalto (CoFe ₂ O ₄)47	
2.6 Magnetita (Fe ₃ O ₄)52	
2.7 Hidroxiapatita	
2.8 Carreadores de Fármaco61	
2.9 Osteomielite	
3 METODOLOGIA	
3.1 ETAPA I - Materiais e Métodos78	
3.1.1 Materiais	
3.1.2 Síntese Química das NPM's79	
3.1.3 Síntese da HAp por precipitação82	
3.1.4 Preparação das NPM's Híbridas84	
3.2 ETAPA II - Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos compósito híbridos (carreadores de fármaco)	S
3.2.1 Materiais	
3.2.2 Obtenção dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco)86	
3.2.2.1 Método I - Inserção do fármaco ciproflonax (γ) e obtenção do compósitos híbridos (carreadores) HAp:NPM's@SiO₂:γ86	S
3.2.2.2 Método II - Inserção do fármaco ciproflonax (γ) e obtenção d	0
compósito híbrido (carreador) HAp:NPM's@SiO₂:γ88	
3.2.2.3 Obtenção dos compósitos híbridos HC e HF	

3.2.2.4 Obtenção dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco) Cγ e Fγ.
3.3.1 Difração do Pajos X = DPX
$3.3.1 \text{ Diração de Raios } A = DRA \dots 32$
3.3.2 Distribuição Granulometrica (DG)
3.3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR93
3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV
3.3.5 Análise Textural93
3.3.6 Medidas Magnéticas94
3.4 Materiais e Métodos utilizados para os ensaios <i>In Vitro</i> dos híbridos e
3.4.1 Materials
3.4.2 Procedimento In Vitro – Citotoxicidade
3.4.3 Liberação de Fármaco dos híbridos e compósitos híbridos (carreadores
de fármaco)99
3.4.3.4 Sistema descontínuo in vitro para liberação do fármaco
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO102
4.1 Etapa I – Obtenção das NPM's, da HAp e dos híbridos NPM's@SiO₂102
4.1.1 Difração de Raios X (DRX)102
4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)109
4.1.3 Análise Textural por Adsorção de Nitrogênio (BET)117
4.1.4 Distribuição Granulométrica119
4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)123
4.1.6 Medidas Magnéticas128
4.2 Etapa II – Compósitos híbridos (carreadores de fármaco)133
4.2.1 Difração de Raios X (DRX)133
4.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).139
4.2.3 Análise Textural por Adsorção de Nitrogênio (BET)144

4.2.4 Distribuição Granulométrica145
4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)150
4.2.7 Medidas Magnéticas153
4.3 Etapa III - Citotoxicidade e liberação de fármaco nos compósitos híbridos (carreadores de fármaco)157
4.3.1 Procedimento In Vitro – Citotoxicidade
4.3.2 Liberação de fármaco nos híbridos e compósitos híbridos (carreadores de fármaco)
4.3.2.1 Método II - Inserção do fármaco ciproflonax (γ) no compósito híbrido
HFeFSγ₂'178
5 CONCLUSÕES
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS183
REFERÊNCIAS184
APÊNDICES
APÊNDICE A - Cálculos Estequiométricos para a obtenção da Fe₃O₄ ou FeFe₂O₄ 209
APÊNDICE B - Cálculos Estequiométricos para a obtenção da Ferrita de Cobalto (CoFe ₂ O ₄)210
APÊNDICE C – Cálculo da quantidade em % de TEOS e APTS211
APÊNDICE D - Valores de volume de poro (VP) e diâmetro de poro (DP) das amostras
APÊNDICE E- Determinação da área superficial (<i>D_{BET}</i>) determinada por Análise textural por adsorção de nitrogênio - BET215
APÊNDICE F – Curva de calibração do fármaco nos híbridos e compósitos
híbridos (carreadores)220
híbridos (carreadores)

indireto, direto e conteúdo do fármaco presente nos híbridos, compósitos
híbridos (carreadores)223
APÊNDICE I – Cálculo dos valores da DL50228
ANEXOS
ANEXO I – Reagentes utilizados na obtenção da hidroxiapatita de cálcio (HAp)
Anexo II - Descrição técnica e farmacêutica do fármaco (γ) ciproflonax231
Anexo III- Relação de impurezas dos reagentes utilizados na síntese das NPM's
Anexo IV- Ficha utilizada para identificação da fase (Fe2O3)235
Anexo V - Ficha utilizada para identificação da fase (CoFe ₂ O ₄)236
Anexo VI Ficha utilizada para identificação da fase (Fe₃O₄)237
Anexo VII- Fichas utilizadas para identificação da fase (Fe₃O₄)238
Anexo VIII - Fichas utilizadas para identificação da fase hidroxiapatita (Ca₅(PO₄)₃(OH) HL e HLC239
Anexo IX - Fichas utilizadas para identificação da fase hidroxiapatita Ca10(PO4)6(OH)2 da JHS Biomateriais240
Anexo X - Fichas utilizadas para identificação das fases (γ), cloridrato de ciprofloxacino (ciproflonax)241

1 INTRODUÇÃO

A aplicação da nanotecnologia à medicina, comumente conhecida como "nanomedicina", é considerada como revolucionária e está sendo explorada por sua potencial aplicação no desenvolvimento de novos carreadores de fármaco, como ferramenta no diagnóstico e tratamento de doenças (Jain *et al.*, 2014; Kim, *et al.*, 2011; Chatterjee *et al.*, 2014, Barkalina *et al.*, 2014, Tietze *et al.*, 2013, Chapman *et al.*, 2013; Garimella e Eltorai, 2017).

Desta forma, a pesquisa científica tem-se voltado para a obtenção de materiais como por exemplo, nanopartículas magnéticas (NPM's), as quais, devido as suas excelentes propriedades mecânicas, magnéticas, térmicas e elétricas despertam o interesse de inúmeros pesquisadores (Jayakrishnan e Ramesan 2017; Shahrousvand *et al.*, 2017; Donescu *et al.*, 2017). Diante disso, diversas NPM's vêm sendo estudadas para biomedicina, em busca de obter biosensores, por exemplo, podemos citar: ferrita de cobalto CoFe₂O₄ (Ryu *et al.*, 2015); γ-Fe₂O₃ (Lee *et al.*, 2011); ferritas mistas de Ni-Zn (Li *et al.*, 2012); NiFe₂O₄ (Singh *et al.*, 2012); Fe₃O₄ (Sundar *et al.*, 2014). Entre as NPM's, a magnetita (Fe₃O₄) e ferrita de cobalto (CoFe₂O₄), têm recebido um notável interesse no campo da nanomedicina como carreadores de fármacos específicos.

Entretanto, estes materiais apresentam como desvantagem a sua hidrofobicidade, e a falta de grupos funcionais para conexão direta com biomoléculas (Gnach e Bednarkiewicz, 2012). Além do que, as NPM's usadas como carreadores de fármaco, devem apresentar suas superfícies adequadamente revestidas para diminuir a toxidade e evitar o reconhecimento destas, pelo sistema mononuclear fagocitário (Liu *et al.*, 2011). Além de apresentarem elevada atividade química nas suas superfícies, e serem altamente propensas à oxidação no ar, o que pode levar a uma perda significativa da magnetização e dispersibilidade. A fim de evitar estes problemas, as NPM's precisam ser protegidas por materiais finos ou espessos-magnéticos para manter a estabilidade e durabilidade individuais das partículas, apresentar facilidade de funcionalização através de grupos

funcionais para se ligar a agentes biológicos, fornecendo melhor proteção contra alta toxicidade (Ta *et al.*,2016).

Nesse contexto, as nanoparticulas magnéticas têm sido revestidas com a sílica SiO₂, formando estruturas (*core-shell*), o que aumenta à sua estabilidade contra degradação/oxidação, biocompatibilidade, hidrofílicidade sendo um material promissor para a liberação de fármaco de alto rendimento, protegendo o núcleo magnético, mantendo as propriedades magnéticas, quando expostas a ambientes fisiológicos, diminuindo a agregação e sedimentação, aumentando o calor de emissão quando expostas ao campo magnético externo (Beg *et al.*, 2017; Cendrowski *et al.*, 2017) além de melhores propriedades de adesão e dispersão estável sob condições fisiológicas (Kango *et al.*, 2013).

Além das NPM's, outro grupo de materiais cerâmicos que despertam grande interesse biológico e médico, devido à ocorrência em diferentes espécies animais e no homem é representado pelas biocerâmicas de fosfato de cálcio, a exemplo da hidroxiapatita (HAp). Estes materiais são bastante usados na reconstrução óssea, devido à sua estrutura química semelhante em comparação com a composição inorgânica do osso humano, apresentando propriedades de biocopatibilidade, osteointegração e osteocondução (Jiang *et al.*, 2014, Gil-Albarova *et al.*, 2012, Heimann, 2013).

No que diz respeito, a área ortopédica, os biomateriais implantáveis têm sido investigados e aplicados, devido a suas propriedades. Exemplos destes incluem: gelatina, polímeros biodegradáveis, polissacáridos e cerâmica bioativas. No caso das biocerâmicas, a hidroxiapatita tornou-se um componente essencial em cirurgias ortopédicas, sendo incrivelmente benéfica para uso em implantes ortopédicos, melhorando o tratamento de muitos defeitos ósseos e doenças ortopédicas (Garimella e Eltorai, 2017) a exemplo da osteomielite.

Neste sentido, a HAp quando associada à nanopartículas inorgânicas (magnéticas ou ópticas) revestidas com a sílica possibilita a formação de compósitos híbridos (carreadores), que podem atuar na formação de biosensores (Kanchana, *et al.*, 2014; Tudorache *et al.*, 2014), que apresente propriedades otimizadas em relação a cada componente individual, e dessa

forma, pode agir como agente de contraste (Ashokan *et al.*, 2010), carreadores de fármacos magnéticos (Venkatasubbu *et al.*, 2013; Aguilar, 2013), agentes de separação (Cui *et al.*, 2011), e ferrofluidos (Bakuzis *et al.*, 2013), por exemplo.

Assim, a literartura reporta que, o desenvolvimento de novos carreadores de fármaco magnéticos tem levado ao interesse de pesquisas na comunidade biomédica. Sendo portanto, um grande desafio. Para tanto, a ação das nanopartículas de magnetita Fe₃O₄ e ferrita de cobalto CoFe₂O₄, se destacam na obtenção de sistemas carreadores que possam ser injetados via intravenosa (Kempe e Kempe, 2010), endovenosa (Li *et al.*, 2013) ou mesmo enxertadas *in situ* (Panseri *et al.*, 2012a) podendo ser direcionada ou mantida em vários locais do corpo por aplicação de um campo magnético externo, que através da vibração das nanopartículas magnéticas gera calor que por sua vez acelera o metabolismo, difunde, direciona e mantém o fármaco no local da doença através do campo magnético.

Por meio desta pesquisa, pretende-se portanto, oferecer uma alternativa mais efetiva e menos invasiva ao tratamento da osteomielite. Atualmente, o material mais utilizado para o tratamento local da doença é o polimetilmetacrilato, combinado a antibióticos, que deve ser retirado cirurgicamente após o período de 30 a 45 dias. Com o novo produto, a reeoperação não será mais necessária, diminuindo a estadia hospitalar e minimizando os custos.

Assim, os compósitos híbridos (novos carreadores) devem apresentar biocopatibilidade, osteointegração e osteocondução da hidroxiapatita associada as características magnéticas das NPM's (Hou *et al.*, 2009; Tran e Webster, 2011; Panseri *et al.*, 2012b) e eficiência do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax).

Baseado nesses aspectos, a motivação para a pesquisa se deu: i) avaliar o uso das NPM's de FeFe₂O₄ e CoFe₂O₄ sintetizadas por reação de combustão em carreadores de fármaco; ii) avaliar o efeito da modificação da superfície nas propriedades das NPM's; iii) desenvolver novos materiais (carreadores), a base das NPM's híbridas, HAp e do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax) no tratamento da osteomielite e iv) investigar a biocompatibilidade destes novos materiais via estudos *in vitro* e a liberação de fármaco.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Materiais Híbridos

Os materiais híbridos podem ser amplamente definidos como materiais sintéticos contendo uma mistura íntima entre os componentes orgânicos e inorgânicos. Esta mistura produz uma sinergia que fornece a esses materiais uma série de propriedades melhoradas em relação aos precedentes individuais, através da seleção dos componentes orgânicos e inorgânicos bem como da escolha apropriada das condições para a sua articulação e transformação (Azevedo *et al.*, 2013).

Os híbridos são homogêneos, devido à mistura dos componentes em nível molecular, usualmente em escala de nanômetro a sub-micrômetro (100-1000 nm). Embora tais materiais sejam macroscopicamente homogêneos, suas propriedades refletem a natureza química dos componentes pelos quais foram formados. Em um material híbrido a fase inorgânica pode ser constituída por sílica ou siloxanos (Benvenutti *et al.*, 2009).

Desta maneira, existem diversos métodos para a preparação de materiais híbridos, tais como: mistura, polimerização *in situ*, automontagem, método sol-gel (MAO *et al.*, 2012). De acordo com a natureza da interface entre os componentes inorgânico e orgânico os materiais híbridos podem ser classificados em três classes das classes I, II e III Jose e Prado (2005); Barud (2010); Benvenutti *et al.*, (2009); Xavier (2010) e Messori *et al.*, (2011).

Classe I: são os materiais preparados por diferentes rotas sintéticas onde não existem ligações covalentes ou iônicas, entre os componentes orgânicos e inorgânicos. Desta forma, nesta classificação só existem fracas interações de Van-der-Waals, pontes de hidrogênio ou forças eletrostáticas. Como demonstrado nas Figuas 1, 2 e 3.



Figura 1 - Moléculas orgânicas (
 imobilizadas numa rede inorgânica (+++) preparada via sol-gel, a partir de precursores inorgânicos (+) (José e Prado, 2005).

Monômeros orgânicos podem ser penetrados nos poros de uma matriz inorgânica e, polimerizados, em processos que têm início por radiação UV, por aquecimento ou por iniciadores de polimerização. O polímero resultante fica entrelaçado à rede inorgânica, gerando uma rede polimérica semiinterpenetrante (semi-IPN) orgânico-inorgânica, conforme ilustrado na Figura 2.



Ocorre à incorporação de partículas inorgânicas em polímeros orgânicos pela rota convencional, através da mistura de polímeros (ou o prépolímero) e as partículas inorgânicas. Pela formação simultânea de duas redes independentes, a partir de precursores orgânicos e inorgânicos, adequadamente funcionalizados, sem ligação química entre as fases, conforme ilustra a Figura 3. Neste caso, o produto pode ser descrito como uma verdadeira rede polimérica interpenetrante (IPN).



Figura 3 - Formação simultânea de duas redes a partir de monômeros orgânicos (AA) e precursores inorgânicos (+) (José e Prado, 2005).

Classe II: Materiais híbridos orgânico-inorgânicos são constituídos de estruturas nas quais os componentes orgânicos e inorgânicos estão interligados por forças fortes do tipo covalente ou iônico-covalente, conforme ilustrado na Figura 4.



Figura 4 - Material híbrido orgânico-inorgânico com ligações covalentes entre as fases (José e Prado, 2005).

Classe III: Baseada na combinação dos dois tipos de interação descritos nas classes I e II. Um exemplo deste híbrido é o material obtido por um polímero orgânico contendo grupos alcoxissilanos, (SiOR)₃, hidrolisáveis, e grupos aceptores de hidrogênio (carbonila, amina, imida, por exemplo), conforme ilustrado na Figura 5.



Figura 5 - Material híbrido orgânico-inorgânico formado por ligações covalentes apresentando pontes de hidrogênio (José e Prado, 2005).

Desse modo, pode-se observar a importância do entendimento do tipo de ligação entre os diferentes materiais inorgânicos para melhor interação entre os componentes orgânicos e inorgânicos. Uma das principais vantagens para a obtenção dos materiais híbridos está na possibilidade de combinar as vantagens dos polímeros orgânicos (fácil processabilidade, baixa densidade e flexibilidade) e dos materiais inorgânicos (alta resistência mecânica, transparência, boa resistência química e estabilidade térmica) (Karatas *et al.*, 2009; Kuan *et al.*, 2003) possibilitando, assim obter um material com propriedades superiores aos materiais individuais.

No entanto, devido à diferença de natureza da ligação química nestes materiais, a interação na camada interfacial é muito fraca. Este problema pode ser resolvido com a introdução de agentes de acoplamento (Lung e Matinlinna, 2012). Os agentes de acoplamento são utilizados como agentes promotores, dispersantes, agentes de reticulação, e modificadores de superfície que visa à otimização da adesão na interface (Sharmin *et al.*, 2012).

Dessa forma, o híbrido orgânico-inorgânico pode ser empregado em uma variedade de aplicações, tais como: materiais ópticos (Rao *et al.*, 2014), eletrônicos (Bousquet *et al.*, 2014), sensores (Murugan *et al.*, 2014), catalisadores (Brooks *et al.*, 2012; Bastürk *et al.*, 2013), adsorventes (Gu *et al.*, 2012), membranas (Kumar e Guliants, 2010), revestimentos (Gashti *et al.*, 2012), materiais de impressão molecular (Joshi *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014) e retardante de chamas (Wang *et al.*, 2014) onde se faz necessário escolher precursores apropriados e utilizar modificadores de superfície e/ou agentes de acoplamento para melhorar a adesão interfacial.

2.2 Modificação de Superfície

O foco central que deve ser abordado na modificação da superfície de nanomateriais consiste no impedimento da agregação espontânea e elucida a interface entre nanomateriais e o biossistema. Entre os nanomateriais inorgânicos, as nanopartículas a base de óxido de ferro tem um elevado potencial para à utilização de uma variedade de estudos *in vitro* e em aplicações *in vivo*. Baseado em seu desenvolvimento físico, químico, térmico, e

propriedades mecânicas, estas nanopartículas oferecem um elevado potencial em várias aplicações biomédicas (Bhattarai *et al.*, 2007).

Porém, nos estudos *in vivo* e/ou *in vitro* feitos a partir de nanopartículas para aplicação biomédica, as nanopartículas devem ter sua superfície modificada para que haja boa biocompatibilidade. Em geral, alto grau de biocompatibilidade ocorre quando o material interage com o corpo sem induzir respostas tóxicas, imunogênicas, trombogênicos e carcinogênicos e contribui para a imunoestimulação e imunossupressão (Naahidi *et al.*, 2013).

Desta forma, as propriedades da superfície das nanopartículas podem afetar grandemente a sua compatibilidade na corrente sanguínea. Pois, os componentes do sangue podem reagir imunologicamente para tornar as nanopartículas hidrofóbicas como substâncias estranhas e desta forma, desencadear reações toxicológicas dentro do organismo através da absorção das nanopartículas pelas opsoninas (proteínas, tais como imunoglobulinas que se liga a micróbios e substâncias estranhas) que são "engolidas" por células fagocíticas e macrófagos (Naahidi *et al.*, 2013).

Assim, a modificação da superfície de nanopartículas por tratamentos químicos (tais como a absorção de agentes de acoplamento do tipo silano) constitui-se em um método útil para melhorar a dispersão, estabilidade e biocompatibilidade de nanopartículas em diferentes meios.

Pode-se observar que, a superfície da NPM's não modificadas são cobertas apenas com grupos -OH, enquanto que, a superfície da NPM's modificadas com silano é coberta com moléculas (3-metacriloxipropil) trimetoxissilano e apresenta melhor dispersão dentro solventes orgânicos ou em matrizes de polímero, em comparação com a NPM's não modificada sua superfície (Kango *et al.*, 2013).

Nesse contexto, observa-se que, a adesão interfacial entre os materiais orgânicos e inorgânicos pode ser melhorada por meio da formação de ligações químicas e físicas que se formam com agentes de acoplamento a exemplo de silanos organofuncionais, que apresentam propriedades tanto orgânicas, quanto inorgânicas e podem reagir simultaneamente com polímeros e componentes minerais cerâmicos, resultando em um material com melhores propriedades de adesão durabilidade (Sharmin *et al.*, 2012) e conjugação

biológica. Na Figura 6, ilustra-se a modificação de nanopartículas de Fe₃O₄ com o TEOS e APTS (3-aminopropiltrimetoxisilano) e consequente formação de grupos reativos –NH₂.



Figura 6 - Modificação de nanopartículas de Fe₃O₄ com o TEOS e APTS (3aminopropiltrimetoxisilano.

Os agentes silanos apresentam uma fórmula geral X (CH₂)nSi(OR)₃, onde OR é um grupo sílico-funcional (como –OCH₃ ou –OC₂H₅), enquanto que X é um grupo organo-funcional (como –CH=CH₂, -Cl, -NH₂ ou –N=C=O). A presença de grupos hidroxilas (-OH) na superfície das partículas é indispensável para promover a reação com agentes de acoplamento do tipo silano (Franke, 2009) onde, os grupos (OR)₃ se hidrolisam formando grupos silanóis (Si-OH) que reagem com materiais inorgânicos. Por outro lado, seu grupo R é capaz de reagir com os monômeros a serem polimerizados formando assim materiais híbridos orgânicos inorgânicos (Materne, 2005; Diaz-Benito *et al.*, 2010).

Os grupos alcoxi dos trialcoxissilanos hidrolizados são espécies contendo silanol. As reações destes silanos envolvem inicialmente a hidrólise dos três grupos alcoxi seguido por condensação de oligômeros. Em seguida, os oligômeros formam ligação de hidrogênio com os grupos OH do substrato envolvendo perda de água. Essas etapas podem ocorrer simultaneamente, após a hidrólise. Na interface substrato–silano haverá apenas uma ligação de silício do organosilano para a interface do substrato. Os dois grupos restantes apresentam-se tanto na forma condensada ou livre do grupo silanol. O grupo R permanece disponível para reação covalente ou interação física com outras

fases (Vanithakumari *et al.*, 2014). A Figura 7, ilustra a ligação do silano com a superfície de uma fibra (substrato inorgânico).





O grupo orgânico sobre o silano pode ser ou não reativo, silanos tais como os listados na Tabela 1, são frequentemente utilizados como agentes dispersantes ou agentes hidrofóbicos. Eles apresentam um grupo orgânico não reativo (X), que é compatível com a matriz, e um grupo alcoxi (OR), o qual reage com o substrato.

Silanos aminofuncionais, como os indicados na Tabela 2, são reativos em ambas as extremidades e, são úteis na melhoria a aderência de todos os tipos de revestimentos.
Silano	Grupo orgânico X	Grupo alcoxi (OR)	Nomenclatura
Xiameter® OFS-6070 Silano	Metil	Metoxi	Metiltrimetoxisilano
Dow Corning® 1-6383 Silano	Metil	Etoxi	Metiltrietoxisilano
Xiameter® OFS-6194 Silano	Metil	Metoxi	Dimetildimetoxisilano
Dow Corning® Z-6265 Silano	Propil	Metoxi	Propiltrimetoxisilano
Xiameter® OFS-2306 Silano	i-butil	Metoxi	Isobutiltrimetoxisilano
Xiameter® OFS-6124 Silano	fenil	Metoxi	Feniltrimetoxisilano
Xiameter® OFS-6341 Silano	n-octil	Etoxi	n-octiltrietoxisilano

Tabela 1- Organossilanos não reativos.

Fonte: Adaptado de Materne, (2005).

Tabela 2 - Silanos aminofuncionais.

Silano	Grupo orgânico X	Grupo alcoxi (OR)	Nomenclatura
Dow Corning® Z-6011	Amina	Etoxi	Aminopropiltrietoxisilan
Silano Xiameter® OFS-6020	Amina	Matavi	o Aminoetilaminopropiltri
Silano	Amina	Meloxi	metoxisilano
Xiameter® OFS-6094 Silano	Amina	Metoxi	Aminoetilaminopropiltri metoxisilano (pureza elevada)
Dow Corning® Z-6137 Silano	Amina	-	Aminoetilaminopropilsil oxano oligômero (aq)
Xiameter® OFS-6032 Silano	Vinil-benzil-amina	Metoxi	viniidenzii- aminoetilaminopropil trimetoxisilano
Xiameter® OFS-6224 Silano	Vinil-benzil-amina	Metoxi	Baixo Cl versão do XIAMETER® OFS- 6032 Silano
Dow Corning® Z-6028 Silano	Benzilamina	Metoxi	Benzil- aminoetilaminopropil - trimetoxisilano

Fonte: Adaptado de Materne, (2005).

Na Tabela 3, estão listados outros organosilanos reativos, que podem ser úteis em uma ampla gama de revestimento e aplicações. Outro tipo de modificador de superfície pertencente ao grupo dos organoalcoxissilanos é o tetraetilortossilicato (TEOS) que é um material de partida pouco dispendioso e livre de haleto (Shekar *et al.*, 2012), é líquido e geralmente tomado como um precursor para formar redes inorgânicas de sílica, também usado para

aumentar a hidrofilicidade de NPM's, apresenta baixo custo e fácil manuseio. Este organoalcoxissilano, assim como o 3- aminopropiltrimetoxisilano (APTS), o tetrametil ortossilicato (TMOS) e o poli dimetoxisiloxano (PDMS) têm sido utilizados em mecanismos reacionais envolvendo hidrólise ácida e poli condensação posterior com polímero inorgânico (Ananth *et al.*, 2012).

Silano	Reatividade Organica X	Grupo alcoxi OR	Nomenclatura
Xiameter® OFS-6030 Silano	Metacrilato	Metoxi	γ-Metacriloxipropiltrimetoxisilano
Xiameter® OFS-6040 Silano	Epoxi	Metoxi	γ-Glixidoxipropiltrimetoxisilano
Xiameter® OFS-6076 Silano	Cloropropil	Metoxi	γ-Cloropropiltrimetoxisilano
Dow Corning® Z-6376 Silano	Cloropropil	Etoxi	γ-Cloropropiltrietoxisilano
Dow Corning® Z-6300 Silano	Vinil	Metoxi	Viniltrimetoxisilano
Xiameter® OFS-6224 Silano	Vinil	Acetoxi	Viniltriacetoxisilano
Dow Corning® Z-6028 Silano	Mercapto	Etoxi	Mercaptopropiltrietoxisilano
Xiameter® OFS-6020 Silano	Dissulfido	Etoxi	Bis-(trietoxisilopropil)-dissulfide
Xiameter® OFS-6094 Silano	Tetrasulfido	Etoxi	Bis-(trietoxisilopropil)- tetrasulfide
Dow Corning® Z-6137 Silano	Ureia	Metoxy	γ-Ureidopropiltrietoxisilano
Xiameter® OFS-6094 Silano	Epoxi/Melamina	Metoxy	Epoxi silano modificado resina melamina

Tabela 3 - Organossilanos reativos adicionais.

Fonte: Adaptado de Materne, (2005).

O principal precursor da sílica é, portanto, formado de um átomo central de silício rodeado de ligantes reativos. A sílica pode ainda ser funcionalizada com grupos reativos como, por exemplo, aminas que podem se ligar a uma variedade de fármacos (Almeida, 2008). A Figura 8 exibe as reações de hidrolise e condensação do TEOS e formação da sílica.

A sílica (SiO₂) é formada, portanto, na superfície das NPM's por hidrólise e condensação do TEOS assim como, de outros precursores organo alcoxisilanos como citado anteriormente formando assim, microesferas magnéticas constituídas de um núcleo magnético e casca (revestimento) – *core-shell* - de sílica. O revestimento não tem a função só de proteger os núcleos magnéticos, mas também de impedir o contato direto do núcleo

magnético com agentes biológicos que proporcionem baixa citotoxicidade e o fácil controle de interações interpartículas, tanto em soluções como dentro de estruturas orgânicas além de uma maior resposta magnética (Faraji *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013; Mauricio *et al.*, 2013).



Figura 8 - formação da sílica através das reações de hidrolise e condensação do TEOS (Adaptado de Lin *et al.*, 2013).

Neste sentido, observa-se que, o revestimento das NPM's proporciona a obtenção de uma superfície biocompatível que apresente alta hidrofilicidade decorrente da presença de grupos (-Si-O-) que permite a inserção de grupos hidrófilos funcionais, tais como: amina, hidroxila e carboxilato que apresentam elevada afinidade com a água e que podem interagir com as espécies biológicas, tais como enzimas, proteínas, aminoácidos e DNA, e podem ainda ser ativadas por um campo magnético que não afeta os tecidos biológicos tornando-as atraentes para utilização em biomedicina (Li *et al.*, 2012; Kango *et al.*, 2013; Mauricio *et al.*, 2013; Sadighian *et al.*, 2014).

Além da modificação da superfície, а biocompatibilidade е multifuncionalidade das NPM's também podem ser aumentadas ou por conjugação biológica ou por incorporação de ligantes em sua superfície, tais como: agentes de direcionamento, permeação, melhoradores ópticos, corantes e agentes terapêuticos (Kango et al., 2013). Por exemplo, a estrutura de nanopartículas magnéticas biocompatíveis que apresenta grupos multifuncionais é ilustrada na Figura 9.



Figura 9 - As nanopartículas magnéticas possuindo vários ligantes, para permitir a multifuncionalidade a partir de um único centro de nanopartículas (Adaptado de Kango *et al.*, 2013).

2.3 Nanopartículas Magnéticas (NPM's)

As nanopartículas magnéticas, (NPM's) são definidas como materiais com tamanho de partícula entre 1-100 nm, o que resulta em uma elevada área de superfície específica, que favorece tanto a reatividade das NPM's com átomos da superfície dos centros ativos quanto às tornam fáceis de serem manipuladas sob a influência de um campo magnético externo (Kanimozhi e Perinbam, 2013) dependendo da composição química, da estrutura cristalina e do tamanho das partículas, estas nanopartículas podem exibir comportamento ferromagnético, ferrimagnético, paramagnético, diamagnético ou superparamagnético.

Ferromagnetismo é uma característica típica dos metais que apresentam alinhamento espontâneo dos seus dipolos magnéticos quando na ausência de campo magnético, podendo se manter orientado ao ser retirado o campo. Acima da temperatura de Curie (*TC*) que é a temperatura na qual a magnetização espontânea desaparece (Cullity e Graham, 1972), esse alinhamento é destruído e o material se comporta como um material paramagnético. Paramagnetismo é uma forma fraca de magnetismo e surge em materiais que possuem momentos magnéticos intrínsecos que não interagem entre si. Os momentos magnéticos encontram-se orientados aleatoriamente não havendo uma magnetização macroscópica líquida ou

global, com a aplicação de um campo magnético externo ocorre o alinhamento dos dipolos na direção do campo (Earnshaw, 2009).

O diamagnetismo é uma forma muito fraca de magnetismo, que só persiste enquanto um campo magnético externo estiver aplicado. Na ausência do campo externo, os átomos de um material diamagnético têm momento nulo (Padilha, 2000). O antiferromagnetismo surge devido aos átomos possuírem momentos de dipolo permanentes adjacentes que integram entre si causando alinhamento antiparalelo, o que só desaparece na temperatura de Néel (Pessoa, 2009). O ferrimagnetismo é resultante de um alinhamento espontâneo entre spins antiparalelos que não se cancelam resultando em uma forte magnetização permanente (Callister e Rethwisch, 2012; Rezende, 1996) e é uma característica típica das cerâmicas ternárias contendo em torno de 70% em peso do óxido de ferro, na forma estrutural da hematita (α -Fe₂O₃) (Rane *et al.*,1994) e os 30 % restantes são de outros óxidos compostos de metais de transição divalentes (por exemplo CuO, NiO, ZnO, MnO e BaO) ou metais terras raras trivalentes (por exemplo Y₂O₃) (Costa *et al.*, 2015).

Quando estes óxidos ternários exibem tamanho de partículas muito pequenas (aproximadamente 10-20 nm para alguns materiais), estas se assemelham a um monodomínio magnético e ocorre o fenômeno de magnetização espontânea em toda a partícula, a qual desmagnetiza espontaneamente por consequência de flutuações térmicas, apresentando assim, uma coercividade e indução remanente zero (Hc = 0 e Mr = 0). Esta denominação "superparamagnetismo" é dada pelo fato destes sistemas apresentarem propriedades análogas aos paramagnéticos, porém com momento magnético muito maior (Knobel *et al.*, 2008).

Estas propriedades superparamagnéticas, são importantes em aplicações biológicas, especialmente quando é necessário para se evitar possíveis embolizações dos vasos capilares. Porém para as NPM's que apresentarem superparamagnetismo a aglomeração deve ser mínima entre as nanopartículas, o que é extremamente difícil, porque pelo fato das partículas terem tamanho nanométrico estas apresentam alta energia de superfície o que causa uma forte atração entre as partículas coloidais, devido às forças de Van der Waals (Morel *et al.*, 2013).

Outra propriedade importante em aplicações biológicas é a dispersibilidade das NPM's em um meio líquido, pois as NPM's devem dispersar em solventes hidrofílicos visto que, a alta dispersibilidade e estabilidade coloidal em um meio fisiológico aumena o tempo de circulação e evita agregação. Segundo Kanimozhi e Perinbam (2013) quando estudaram a síntese de nanopartículas de Fe₃O₄ superparamagnéticas amino silanizadas modificadas e sua aplicação na imobilização da lipase de Pseudomonas fluorescens Lp1. Os autores mostraram que as NPM's modificadas a superfície com amino-silanos possuem boa dispersão em água, metanol, etanol e isopropanol. Por outro lado, nos solventes n-hexano e acetato de etila as partículas se agregaram e logo sedimentaram na parte inferior, como se pode observar na Figura 10.



Figura 10 - Dispersibilidade de nanopartículas magnéticas em diferentes solventes (Kanimozhi e Perinbam, 2013).

Assim, o pequeno tamanho, a alta dispersibilidade, a morfologia uniforme, e o magnetismo das NPM's são normalmente necessários para a aplicação da nanopartículas magnéticas na área biomédica (Lin *et al.*, 2013; Kango *et al.*, 2013).

Atualmente, vários tipos de nanopartículas magnéticas (NPM's) cerâmicas vêm sendo estudadas em diversas aplicações como, por exemplo, catálise (Ozyilmaz *et al.*, 2014; Safari e Javadian, 2015), resíduos de tratamento de água (Yu *et al.*, 2015), têxteis (Shanehsaz *et al.*, 2015), tintas (Trinchi *et al.*, 2015), distribuição de fármaco (Thayyath *et al.*, 2015), imagem de ressonância magnética (IRM) (Jinxia *et al.*, 2015), engenharia de tecidos (Ngadiman *et al.*, 2015) e tratamento de câncer (Tietze *et al.*, 2015), imobilização de enzimas e biomoléculas (Atacan e Özaca, 2015), biossensor (Wang *et al.*, 2011), hipertermia, (Shundo *et al.*, 2012, tais aplicações emanam

sobretudo do tamanho nanométrico das NPM's (Kango *et al.*, 2013; Ladj *et al.*, 2013).

De modo particular a aplicação de NPM's cerâmicas utilizadas como carreadores de fármaco na biomedicina é um campo relativamente novo, porém vem crescendo significativamente. Assim, para melhor avaliação desses estudos foi realizado uma pesquisa de publicações a partir do ano 2011 até até 2017 na plataforma *online Sciencedirect* utilizando como termos "*magnetic nanoparticles*", "*drug delivery*".

A distribuição dessas publicações entre os anos de 2011, até 2017 encontra-se ilustrada na Figura 11, podendo assim, atestar o crescimento do número de estudos nessa área.





Pode-se observar que ao passar dos anos o número de publicações sobre as NPM's aplicadas como carreador de fármaco vem aumentando cada vez mais com projeção para o final de 2015 com maior número de publicação quando comparado aos anos anteriores. Na Figura 12 ilustra-se o histograma de sistemas de NPM's mais usadas como carreador de fármaco no período de 2011 até 2017.



Figura 12 - Histograma de sistemas de NPM's mais usadas como carreador de fármaco no período de 2011 a 2017.

Por meio dos histogramas expostos na Figura 12, observa-se que os sistemas de NPM's mais estudados para aplicações biológicas como carreador de fármaco nos últimos cinco anos são as ferritas de cobalto (CoFe₂O₄) e a magnetita (Fe₃O₄). Estas NPM's apresentam uma ascenção no número de trabalhos reportados dos anos de 2011-2017 para aplicação dessas NPM's como carreador de fármaco. Fato esse que se destaca principalmente pela não toxicidade dessas NPM's, facilidade de processamento, baixo custo durante a síntese, capacidade de conjugação biológica e forte magnetização.

A pesquisa foi feita na plataforma *online Science Direct* utilizando como termos "*magnetic nanoparticles*", "*drug delivery*" e cada tipo de nanopartícula especificados no histograma da Figura 12.

2.4 Ferroespinélio FeFe₂O₄ e CoFe₂O₄

Ferroespinélio é um termo dado a todas as cerâmicas ternárias com estrutura cristalina do tipo espinélio (mineral natural MgAl₂O₄) cuja composição química é constituída em torno de 70% de óxido de ferro na forma de hematita (Fe₂O₃) e os 30% restantes são de outros óxidos compostos de metais de transição divalentes como por exemplo, (CuO, NiO, ZnO, MnO e BaO) ou metais terras raras trivalentes (Y₂O₃). Dentro dessa categoria estão incluídas as cerâmicas magnéticas com fórmula química tipo M²⁺[Fe₂³⁺]O₄ e condutividade elétrica relativamente alta. Esses materiais apresentam curva de histerese quando submetidos a um campo magnético externo (Costa *et al.*, 2015).

O sistema cristalino deste material é cúbico, grupo espacial Fd3m com arranjo compacto de íons de oxigênio em uma rede cúbica de face centrada (CFC), composto de oito sub-fórmulas gerando uma estrutura cristalina ternária do tipo AB₂O₄ (Callister e Rethwisch, 2012). Esse tipo de estrutura possibilita uma distribuição dos cátions no retículo cristalino, em sítios tetraédricos e octaédricos, cujos vértices são ocupados por átomos de oxigênio. Os íons metálicos ocupam os interstícios entre os átomos de oxigênio (Verwey e Helmann, 1947). Nesta estrutura AB₂O₄, *A*, representa os íons metálicos divalente, e *B* representa os íons metálicos trivalentes. De modo que, os átomos são dispostos nos seguintes sítios cristalográficos: sítios tetraédricos com 8 íons metálicos *A* e/ou *B*; sítios octaédricos com 16 íons metálicos *A* e/ou *B*; e 32 íons de oxigênio que constituem os vérties dos tetraedros e octaedros.

Na Figura 13, ilustra-se a estrutura do espinélio, com as posições octaédrica e tetraédrica. Esses materiais cerâmicos ferrimagnéticos também são conhecidos como materiais magnéticos moles (*soft*) ou de alta permeabilidade, e são utilizados para criar um alto fluxo magnético a partir de uma corrente elétrica, ou então para induzir uma grande indução magnética

devido a um campo externo variável (Rezende, 1996). Com exceção tem-se o espínélio CoFe₂O₄ que possui estrutura inversa e é um material com característica de um magneto duro (Amiri e Shokrollahi, 2013; Santos, 2015).

Para indicar a distribuição de cátions em relação aos sítios tetraédricos e octaédricos, adota-se uma convenção apresentada na forma [A]{B₂}O₄, em que [] representa sítios tetraédricos,{} representa sítios octaédricos e A representa o íon metálico bivalente no sitio tetraédrico e B o íon metálico trivalente no sitio octaédrico (Fairweather *et al.*, 1952). Dependo da estrutura iônica dos cátions pode-se classificar a estrutura como sendo espinélio normal- $A(B)_2O_4$ ou (A^{2+}) [B³⁺B³⁺]O₄ e espinélio inverso - B(AB)O₄ ou $(B^{3+})[A^{2+}B^{3+}]O_4$ (Cullity, 1972).



Figura 13 - Esquema ilustrativo da célula unitária do espinélio. (a) sítio tetraédrico (Sítio -A); (b) sítio octaédrico (Sítio -B); (c) célula unitária da estrutura de espinélio e (d) ampliação de 2/8 da célula unitária para melhor visualizar a disposição dos cátions e do aníon nos sítios A e B (Adaptada de Junior *et al.*, 2009).

Muitos espinélios de ocorrência natural têm distribuição de cátions intermediária entre os tipos normal e invertida. A distribuição iônica pode ocorrer com alguma inversão δ , nos espinélios, [A 1- δ , A δ] {A δ B2- δ }O₄. Onde δ é o grau de inversão. Para espinélio normal δ = 0 e para espinélio invertido δ = 1 (Cullity, 1972). Quando contêm dois íons divalentes diferentes podem ser chamadas de estrutura de espinélio mista, por exemplo, (Ni, Zn)Fe₂O₄ (Rezende,1996).

Dentre os vários tipos de espinélios existentes será dado ênfase nessa tese aos ferroespinélios do tipo inverso o CoFe₂O₄ (ferrita de cobalto) e FeFe₂O₄ (magnetita) (Komarneni *et al.*, 2012), os quais são sistemas de cerâmicas magnéticas que se destacam para aplicações biomédicas como carreadores de fármaco, principalmente pela não toxicidade, facilidade de serem revestidas com a sílica SiO₂, formando híbridos, fácil conjugação com

biomoléculas, serem processadas na forma nanoparticuladas, formar compósitos híbridos quando.

2.5 Ferrita de Cobalto (CoFe₂O₄)

A ferrita de cobalto é o único ferroespinélio do tipo inverso, (Fe³⁺) {Co²⁺ Fe³⁺}O₄, considerado como material magnético duro (*hard*), devido este material apresentar alta coercividade (Hc), segundo Costa *et al.*, (2015) a coercividade da ferrita de cobalto é de 2,5 × 10⁴ Oe e magnetização de saturação moderada (Ms). De acordo com Santos (2015), a ferrita de cobalto apresenta magnetização de saturação (Ms) de 58 meu/g e excelente estabilidade química e dureza mecânica (Emadi *et al.*, 2015; Avazpour *et al.*, 2015). Amiri e Shokrollahi, 2013, reportam que, materiais com valores de coercividade maior que 10⁴ A/m (1256,64 Oe) são considerados magnéticos duro, apresentando magnetização permanente, não sendo, portanto facilmente desmagnetizados (imã permanente). Materiais com valores de coercividade menor que 500 A/m (6,28 Oe) são considerados mole como, por exemplo, a magnetita (FeFe₂O₄) (Sinnecker, 2000).

Segundo Amiri e Shokrollahi, (2013) a ferrita de cobalto (CoFe₂O₄) apresenta boa capacidade de ser funcionalizada com fármaco, sendo aplicada em sistemas de distribuição de fármaco, especialmente a quimioterapia com potencial aplicação para uso terapêutico e diagnostico na biomedicina. Estudos também relatam que, devido as propriedades magnéticas, físicas e químicas a ferrita de cobalto têm sido vastamente aplicada como fluido magnético (Kückelhaus, *et al.*, 2004), carreadores de fármaco ativados magneticamente (Wu *et al.*, 2011), agentes de contraste para MRI (Biasi *et al.*, 2015; Sattarahmady *et al.*, 2015), isolamento de DNA (Prodělalová *et al.*, 2004), sensores de gás (Caltun *et al.*,2008), optoeletrônica (Ramesh *et al.*, 2013), e dispositivos de frequência de micro-ondas (Hannour *et al.*, 2014).

Devido a importância da ferrita de cobalto (CoFe₂O₄) em aplicações biomédicas a seguir será feito um breve resumo sobre alguns trabalhos relevantes nos nessa área. Kim *et al.*, (2008) sintetizaram nanopartículas de CoFe₂O₄, dispersa em água, e a investigou como agentes de aquecimento para a entrega de fármaco termo-magnético e hipertermia. Durante as experiências de aquecimento, cada uma das soluções de nanopartículas CoFe₂O₄ atingiu um estado estacionário em que a temperatura aumentou entre 0,1 e 42,9 °C acima das condições ambiente, quando um campo magnético de 127-634 Oe foi aplicado a 231 ou 266 kHz. A geração de calor mostrou ser dependente da intensidade do campo magnético e frequência aplicada. Por conseguinte, o aquecimento desejado para a entrega de fármaco magneticamente desencadeada ou hipertermia pode ser alcançado em nanopartículas CoFe₂O₄ disperso em água ajustandose o campo magnético e frequência.

Pershina *et al.*, (2009) investigaram a interação entre DNA e nanopartículas de ferrita de cobalto por espectroscopia de FTIR. A CoFe₂O₄ foi preparada pelo método químico mecânico. Os autores observaram que o DNA se ligou de forma eficiente a CoFe₂O₄ em soluções aquosas (Tris-HCl), formando um bionanocompósito. A capacidade de adsorção do DNA nas nanopartículas de CoFe₂O₄ foi avaliado e apresentou valor de 5,25 × 10^{-3} mol/m². A dessorção de DNA a partir da superfície das nanopartículas foi analisada ao alterar o pH, a força iônica, e composição química do meio. O nanocompósito DNA-CoFe₂O₄ foi investigado por espectroscopia de FTIR. O bloco de dados permitiu considerar o mecanismo da interação entre um polinucleótido e nanopartículas CoFe₂O₄ supondo a presença da ligação, devido à interação da coordenação dos grupos de fosfato e bases heterocíclicas de DNA (átomos de oxigênio da timina e guanina) com ions metálicos na superfície da nanopartículas, confirmando a formação do bionanocompósito.

Guglielmo *et al.*, (2010) reportaram a embriotoxicidade da ferrita de cobalto e nanopartículas de ouro *in vitro* por meio do ensaio padrão TSE que permite classificar as substâncias forte, fraca ou não-embriotoxicas expondo as nanopartículas de cobalto revestidas com ouro e silanotiol a células-tronco embrionárias (ES-D3) apenas durante os primeiros 5 dias do ensaio. Os resultados obtidos permitiram classificar as nanopartículas de ferrita de cobalto revestidas com ouro e silanopartículas de cobalto revestidas primeiros 5 dias do ensaio. Os resultados obtidos permitiram classificar as nanopartículas de ferrita de cobalto revestidas com ouro e silanopartículas de ferrita de cobalto revestidas com ouro e silanos. No caso da ferrita recoberta com silano, esta

48

apresentou-se como fracamente embriotoxicas e não embriotoxicas quando recobertas com ouro.

Wang et al., (2011) prepararam o híbrido CoFe2O4/SiO2 pelo método de Stöber et al., (1968) utilizando como precursores da sílica o 3aminopropiltrimetoxisilano (APTS) e o TEOS (tetraetilortosilicato). Os autores observaram nos espectros de FTIR e espectro de Raman a presença de funcionais reativos responsaveis pela conjugação biológica grupos provenientes do TEOS e APTS tais como: Si-OH; NH₂ e CH₂. Por meio das curvas de histerese observou-se que os valores de Ms foram de 51,7 meu.g⁻¹ para as NPM's de CoFe₂O₄ e de 35,4 emug⁻¹ para o híbrido CoFe₂O₄/SiO₂. Essa diminuição no valor da Mr deu-se devido ao revestimento das NPM's com a SiO₂ 0 nanohíbrido apresentou distribuição estreita, morfologia aproximadamente esférica com partículas de tamanho aproximadamente igual a 60 nm apresentando grande potencial biológico para aplicações, tais como material para a imobilização de enzimas.

Wu et al., (2011) sintetizaram pelo método de co-precipitação solvotérmica (híbridos) formados por multicamadas de nanotubos de carbono com ferrita de cobalto (MWCNT)/CoFe2O4. Estudos in vitro revelaram que o híbrido (MWCNT)/CoFe₂O₄ apresentou baixa toxicidade apresentando cerca de 80% da viabilidade celular após 24 horas de tratamento, atividade hemolítica desprezível, e um excelente efeito sobre as células cancerosas. Além disso, o híbrido (MWCNT)/CoFe₂O₄ apresentou uma elevada capacidade de (DOX) carreamento para 0 fármaco anticancerígeno doxorrubicina apresentando potencial aplicação tanto como agentes de contraste de imagem em ressonância magnética, como em sistemas de distribuição de fármaco anticâncer para diagnóstico simultâneo e quimioterapia para tratamento do câncer.

Covaliu *et al.*, (2013) ao estudarem a obtenção de materiais nanoestruturados híbridos de CoFe₂O₄ revestidos por biopolímeros polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG) com a finalidade de aplicações biomédicas. Os autores obtiveram nanohíbridos magnéticos cujos valores de Ms para CoFe₂O₄, CoFe₂O₄/PVP e CoFe₂O₄/PEG foram de: 54,9, 60,1 e 63 [Am²/kg] respectivamente, além do comportamento magnético os

autores testaram a viabilidade biológica das nanopartículas não revestidas de cobalto e dos híbridos em bactérias *Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Salmonella enterica sorovar typhimurium* e levedura Candida scotti e avaliaram o efeito tóxico e a eficiencia do híbrido e concluíram que este, não apresenta atividade tóxica e apresenta atividade antioxidante sendo promissor em aplicações biológicas.

Khan et al., (2014) desenvolveram um nanocompósito constituído por polianilina/CoFe₂O₄, em solução aquosa, pelo método de polimerização da anilina, para inibir o crescimento da produção da bactéria, Candida albicans 077 nas concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL de polianilina nas NPM's de CoFe₂O₄. Os autores, observaram que, a atividade anticandida do compósito é diretamente proporcional a concentração de polianilina utilizada, onde a inibição quase completa de crescimento foi observada na concentração máxima de 15 mg/mL, onde houve uma maior interação entre as NPM's de CoFe₂O₄ e a polianilina. O nanocompósito apresentou-se também, com características antioxidante. Dessa forma, os autores concluíram que o nanocompósito polianilina/CoFe₂O₄ mostrou-se promitente atividade anticandida.

Kooti et al., (2015)relataram а obtenção do compósito (CoFe₂O₄/SiO₂/Ag), por meio do revestimento das nanopartículas de CoFe₂O₄ pelo método de Stöber et al., (1968) com o tetraetilortosilicato (TEOS), em seguida, as nanopartículas de prata (Ag) foram encrustadas por meio de redução química do compósito de nitrato de prata. A atividade antibacteriana do compósito CoFe₂O₄/SiO₂/Ag, foi aplicada isoladamente e combinada ao fármaco estreptomicina. Seu efeito, foi investigado contra bactérias Grampositivas e Gram-negativas, empregando ensaio de difusão em disco. Foram utilizadas concentrações do fármaco de 40 e 80 mL-1 impregnados no CoFe₂O₄/SiO₂/Aq. Os autores, observaram que, a bacteremia tericidal, avaliada através do diâmetro de zonas de inibição, foi maior no compósito combinado com o fármaco estreptomicina, indicando sua conjugação com o compósito CoFe₂O₄/SiO₂/Ag, sendo promissores como carreadores de fármaco.

Yunok *et al.,* (2016) sintetizaram nanopartículas de CoFe₂O₄ sendo sua superfície modificada com o ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) e

conjugada com o fármaco Doxorubucina (Dox) para avaliar a termoterapia e quimioterapia de células cancerosas do tipo MDA-MB-231. Os resultados obtidos evidenciaram que a Dox foi liberada no híbrido CoFe2O4@DMSA, em que, os grupos amina da Dox ligaram-se a DMSA através de interação eletrostática e por pontes de hidrogênio com a CoFe₂O₄, absorvendo células cancerosas a partir do processo típico de endocitose e posteriormente o sistema CoFe₂O₄@DMSA foi transportado no sistema endossomal intracelular/lisossomal e sob um campo magnético alternado (AMF) a liberação da Dox ocorreu de forma acumulada e com concentrações elevadas no nível subcelular nos locais desejados e exibiram um efeito sinérgico de uma citotoxicidade celular aumentada pelos efeitos combinados da quimioterapia térmica. É importante notar que as nanopartículas CoFe₂O₄ carregadas com Dox, com sensibilidade ao pH e à temperatura, induziram apoptos celulares significativos que foram mediadas de forma mais eficiente na membrana mitocondrial ativa. Assim, o sistema CoFe2O4@DMSA foi eficaz como carreador da Dox e pode ser utilizado como um agente terapêutico na terapia do câncer combinando com técnicas de termo-quimioterapia.

Samavati e Ismail (2017) avaliaram as propriedades antibacterianas contra bactérias Gram-negativas Escherichia coli (E. coli) de nanopartículas de ferrita de cobalto substituídas por cobre (Cu_xCo_{1-x}Fe₂O₄), onde x = 0,0, 0,3, 0,5, 0,7 e 1,0, sintetizadas pelo método de co-precipitação. A estrutura cristalina e as propriedades antibacterianas das amostras em função do teor de Cobre substituídos foram sistematicamente estudadas. Com o aumento da concentração de Cu, o tamanho das nanopartículas diminuiu de 30 para 20 nm. Pelo FTIR observaram bandas de absorção fundamentais proeminentes em 595 e 419 cm⁻¹ de metais em locais tetraédricos e octaédricos, respectivamente. Os resultados indicaram que a substituição de Co por Cu em nanopartículas de ferrita de cobalto influencia fortemente a microestrutura, estrutura cristalina e diâmetro de partícula, além de melhorar as propriedades antibacterianas.

2.6 Magnetita (Fe₃O₄)

A magnetita, é um óxido ferroso constituído por dois tipos de íons ferrosos, Fe^{2+} e Fe^{3+} , possui estrutura de espinélio inverso com fórmula estrutural (Fe^{3+})[Fe^{2+} Fe^{3+}]O₄, sendo a formula estrutural mais utilizada a Fe_3O_4 . Nesta estrutura os spins emparelhados do Fe^{+3} localizados nos sítios tetraédricos e octaédricos distribuídos igualmente em direções opostas, se anulam gerando comportamento antiferromagnético nestas duas posições. Porém os íons de Fe^{2+} estão desemparelhados na posição octaédrica, sendo, portanto responsável pelo ferrimagnetismo deste material (Komarneni *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013).

Quanto ao seu comportamento magnético, a magnetita é um tipo de ferrita mole, considerados magnetos não permanentes ou de alta permeabilidade, ou seja, materiais que são facilmente magnetizados e desmagnetizados. O valor de coercividade para estas ferritas ocorre para campos baixos, Hc $\leq 10^3$ A/m (Costa *et al.,* 2015).

As nanopartículas de magnetita fazem parte de uma espécie importante de material ferrimagnético utilizado para aplicações biotecnológicas e biomédicas devido à baixa toxicidade, estabilidade química e natureza não carcinogênica (Yuan *et al.*, 2011), sendo utilizada em aplicações tais como: biosseparação (Long *et al.*, 2015), hipertermia (Brollo *et al.*, 2016), ferrofluidos (Slavov *et al.*, 2010), carreador e transporte de fármacos (Lu *et al.*, 2013, Sadighian *et al.*, 2014), agente de contraste em ressonância magnética, radioterapia, transportador para as macromoléculas oligonucleótideas e enzimas (Kanimozhi e Perinbam, 2013). A Fe₃O₄ também tem sido utilizada em processos ambientais tais como o tratamento de águas residuais (Fajaroh *et al.*, 2012). Devido sua importância na área biotecnológica a seguir será feito um breve relato sobre algumas pesquisas mais relevantes nessa área nos últimos anos.

Tran e Webster, (2011) avaliaram a Fe₃O₄ revestida com a HAp. Os autores realizaram testes de absorção, proliferação, densidade de osteoblastos humanos e atividade de mineralização óssea (ALP). Os autores obtiveram partículas nanométricas inferiores a 20 nm que foram absorvidas pelos

osteoblastos com eficiência, a proliferação da Fe₃O₄-HAp nos osteoblastos ocorreu em aproximadamente cinco dias, sendo que a densidade de absorção do compósito Fe₃O₄-HAp em osteoblastos alcançou seu nível máximo após 5 dias, sendo cerca de duas vezes superior a Fe₃O₄ pura e cuja atividade de ALP (marcador da formação do osso através da mineralização óssea) foi de 10 vezes a mais quando comparada a Fe₃O₄ pura. Por meio destes resultados os autores concluíram que o compósito Fe₃O₄-HAp é promissor para aplicações ortopédicas.

Huang *et al.*, (2012a) sintetizaram compósitos formados por Fe₃O₄ em matrizes de sílica mesoporosas pelo método sol-gel para uso como carreador do fármaco aspirina. Medições magnéticas revelaram que este compósito apresentou reatividade suficiente sob campo magnético externo biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e liberação prolongada difusa para a aspirina in vitro. Este compósito magnético apresentou taxa de absorção alta e liberação rápida, sendo assim, um candidato promissor para a bioadsorção e entrega do fármaco aspirina.

Kumari e Singh (2013) sintetizaram nanopartículas híbridas de Au-Fe₃O₄ dispersas em ácido glicólico e funcionalizadas com quitosana para se obter scaffolds. Os resultados in vitro foram realizados em células de fibroblasto de rato. De acordo com os resultados obtidos observou-se que, o híbrido Au-Fe₃O₄ incorporado no suporte apresentou uma morfologia porosa, esférica e estável de tamanho entre 5-10 nm, onde os poros antes da adição do fármaco (ciclofosfamida) apresentaram tamanho entre 3,37-5,28 µm e diminuíram após a adição do fármaco, passando a apresentar tamanho dos poros entre 3,4-4,9 µm. A absorção do Au-Fe₃O₄-fármaco no suporte (scaffold) foi investigado em diferentes soluções: HCI, NaOH e soluções de fluido corporal (SBF) (pH 7,4). Sendo a liberação do fármaco da superfície do suporte mais elevada na solução de SBF, ocorrendo inicialmente de forma rápida (até 200 min), e posterior diminuição com o tempo após 250 minutos. Quanto à proliferação das células cultivadas sobre o suporte de quitosana/ácido glicólico observou-se uma maior absorção durante as primeiras 2h, com ligeira diminuição no número de células em torno de 4h.

Chen et al., (2013a) produziram um nanocarreador de doxorrubicina

(DOX) multifuncional de Fe₃O₄@C@Ag com boa dispersibilidade. Os autores observaram pelos testes *in vitro* que o carreamento do fármaco foi de 997 mg/g, enquanto que, a eficiência de encapsulação atingiu 78,51%. O valor excedeu o valor permitido para carreamento do fármaco, que é sempre abaixo de 900 mg/g. Quanto ao híbrido Fe₃O₄@C@, este apresentou excelente resposta magnética quando submetido a um campo magnético externo. A magnetização de saturação do híbrido Fe₃O₄@C@Ag foi de 25 emu/g, sendo este valor aceitável para a síntese de um nanocarreador aplicado como um sistema multifuncional de manipulação magnética, terapia, imagem e diagnostico na biomedicina.

Chen *et al.*, (2013b) produziram nanocompósitos Fe₃O₄@Ag revestidas com a glicose polimerizada como carreador do fármaco aspirina. Os autores investigaram o transporte e liberação do fármaco em diferentes meios e verificaram que os nanocompósitos magnéticos exibiram uma boa capacidade de transportar a aspirina até 23 %. A liberação do fármaco foi investigada em diferentes meios (água, solução tampão de fosfato e solução de NaCl). A liberação cumulativa do fármaco na solução de NaCl foi maior do que em solução de água deionizada e na solução tampão de fosfato. Quanto ao tempo, ocorreu liberação rápida do fármaco nos 10 min iniciais.

Yan *et al.*, (2014) sintetizaram nanoestruturas de Fe₃O₄ conjugada com o fármaco anticancerígeno doxorrubicina (PN) revestida com a quitosana. Por meio dos resultados obtidos, os autores observaram a formação de nanoestruturas esféricas com tamanho de partícula média final de cerca de 50 nm. A análise do magnetômetro de amostra vibrante (VSM), mostrou que o valor de saturação da magnetização (Ms) foi de 6 emu/g. O comportamento de liberação do fármaco a partir das nanopartículas foi investigada, tanto em soluções ácidas como em soluções neutras tamponadas e os valores obtidos foram de 5,3 e 7,4 respectivamente. Quando o fator avaliado foi o pH, foram analisados o pH de 5,3 e 7,4 durante 7 dias. Os resultados obtidos sugeriram que a liberação foi aumentada duas vezes a um pH 5,3 em comparação com pH 7,4 durante 7 dias. Os resultados mostraram que as nanopartículas reagiram com êxito para o campo magnético externo e pH. Os autores concluíram, portanto, que esta metodologia pode ser usada para melhorar a

54

eficácia terapêutica dos fármacos anticancerígenos.

Huang *et al.*, (2015) sintetizaram o compósito hidroxiapatita/cisplatina (HAp/CDDP) pelo método de microemulsão e a magnetita (Fe₃O₄) foi então, precipitada sob sua superfície. O compósito obtido, foi então avaliado na terapia contra o câncer de pulmão e hipertermia. O compósito obtido, foi caracterado por DRX, MET, propriedades magnéticas. Por meio dos resultados obtidos, observou-se que, a fase principal é constitida pela hidroxiapatita, onde o material é nanocristalino e apresenta-se na faixa de 50-80 nm, apresentando propriedades superparamagnéticas capaz de induzir o calor dentro do corpo em minutos. Os autores relataram que, na terapia contra o câncer de pulmão, o compósito mHAp/CDDP proporcionou um efeito sinérgico contra a proliferação de células A549 e contra o crescimento tumoral e apresentam grande potencial para o tratamento do câncer de pulmão

Anjaneyulu e Vijayalakshmi, (2016) desenvolveram revestimentos de hidroxiapatita [HAp:(Ca)10 (PO4)6(OH)2] obtida pelo método sol gel e magnetita (Fe₃O₄) sobre liga de Ti-6Al-4V por tratamento alcalino utilizando várias concentrações de nanoparticulas de Fe₃O₄ tais como 1, 3 e 5% em massa, respectivamente. O estudo de bioatividade in vitro confirmou que o compósito de HAp/Fe₃O₄ revestido com Ti-6Al-4V apresentou propriedades altamente bioativas e induziu a neo formação óssea com apatita. Estudos de resistência evidenciaram que, os compósitos com 1% de Fe₃O₄ apresentam comportamento anti-corrosivo superior aos compósitos com 3,5% de Fe₃O₄, devido a grupos Fe-OH inferiores e uniformes na camada aderente que restringiu a lixiviação de ions. Deste modo, este estudo sugeriu que o compósito HAp/Fe₃O₄ pode ser utilizado para aplicações biomédicas.

Ahmadzadeh *et al.*, (2017), sintetizaram NPM's revestidas com HAp utilizando bactérias *Enterobacter Aerogenes* no processo de biomineralização. O precipitado resultante foi então, calcinado a 600 °C e investigados no que diz respeito, às características estruturais, tamanho de partícula e força magnética. Os efeitos das NPM's e NPM's revestidos com HAp (HAp-MNPs) na viabilidade de linhas de células MCF-7 humanas através de ensaios da atividade mitocondrial (MTT) e lactato desidrogenase (LDH) foram estudados. Por meio dos resultados, observou-se que, o compósito HAp-NPM's, apresentou

propridades nanoestruturais de diâmetro entre 3-25 nm e 20-80 nm, respectivamente para as NPM's e HAp-NPM's. O compósito HAp-NPM's sintetizados biologicamente formaram uma suspensão estável e mantiveram sua propriedade magnética. A magnetização de saturação (Ms) de HAp-NPM's foi de aproximadamente 10 emu g⁻¹. Os resultados da viabilidade das linhagens celulares indicaram que o revestimento das NPM's via biomineralização apresentou-se promissora para sintetizar nanopartículas magnéticas bio-compatíveis com características estruturais físicas e químicas adequadas. Onde, o nível de toxicidade das NPM's foi reduzido em 10 vezes quando revestido com a HAp.

2.7 Hidroxiapatita

As apatitas são representadas geralmente pela fórmula M_{10}^{2+} (BO₄³⁻)₆ X₂⁻, onde: M = Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Re³⁺, Na⁺, K⁺. Em que, BO = PO₄³⁻, AsO₄³⁻, VO₄³⁻, SO₄²⁻, SiO₄⁴⁻, e X = F⁻, Cl⁻, OH⁻, Br⁻, O²⁻. Apresentam-se dispersas na natureza como constituintes principais de rochas ígneas e metamórficas, em grandes depósitos e em vários locais do mundo. Sua forma predominante é a apatita de cálcio, Ca₁₀ (PO₄)₆ X₂. Substituindo-se os ânions X por OH⁻ tem-se a hidroxiapatita (Bicalho *et al.,* 2008).

A hidroxiapatita apresenta grande interesse biológico, por ser o principal constituinte inorgânico de ossos e dentes dos seres vertebrados, pode ser usada normalmente utilizado para a preparação de biomateriais para substituição e/ou reparo de tecidos duros, na reparação e mineralização óssea, como substitutos de ossos, implantes, revestimentos dentários e próteses ortopédicas (Arcos e Vallet-regi, 2013; Rey e Combes, 2016).

A presença de duas unidades de fórmula na célula unitária do HAp de fórmula química dupla utilizada (Ca₁₀ (PO₄)₆(OH)₂ Vs. Ca₅(PO₄)₃(OH), justifica a existência de dois polimorfos de HAp que são conhecidos: a forma monoclínica, que ocorre no grupo espaço monoclínico P21/b, e o hexagonal, grupo espacial P63/m (Bigi, Boanini e Gazzano, 2016). A forma monoclínica é facilmente desestabilizada pela presença de quantidades muito pequenas de impurezas. A razão pela qual a forma hexagonal é geralmente encontrada em

apatitas biológicas. Além disso, a forma monoclínica é transformada em hexagonal a temperaturas acima de 250 °C (Dorozhkin, 2011). A Figura 14, apresenta a vista em perspectiva ao longo do eixo c do ambiente do local onde estão os ions OH⁻



Figura 14 - Vista em perspectiva ao longo do eixo c do ambiente do local onde estão os íons OH⁻. Alguns dos ions de substituição possíveis são relatados. Os dois triângulos juntam os íons Ca (II) no mesmo nível ao longo do eixo c (Bigi, Boanini e Gazzano, 2016).

Esta estrutura "aberta" e flexível explica a grande variedade de materiais catiônicos e aniônicos que a hidroxiapatita pode hospedar. Em particular, as distâncias mais curtas e seu estrito alinhamento em colunas entre os átomos Ca (I) o torna mais adequado para cátions mais pequenos. Por outro lado, as distâncias entre os cátions Ca (II) são relativamente grandes e os átomos de Ca (II) em camadas consecutivas são escalonados, de modo que, este local pode acomodar cátions maiores (Bigi, Boanini e Gazzano, 2016).

Assim sendo, a estrutura da hidroxiapatita é capaz de incorporar outros íons substituindo pelos cátions Ca^{+2} bem como, pelos ânions OH^- e PO_4^{-3} sem grande distorção da estrutura (Chengyuan *et al.*, 2011). Em particular, a hidroxiapatita deficiente de Ca^{+2} pode ser parcialmente substituída metabolicamente por: Na⁺, Mg⁺², Sr⁺², K⁺ e alguns oligoelementos importantes, como Pb⁺², Ba⁺², Zn⁺², Fe⁺² e PO₄⁻³. Os grupos são substituídos parcialmente por CO₃⁻², (carbonato - apatita, dahlite), enquanto OH⁻ pode ser substituído por CO₃⁻², Cl⁻ e em especial F⁻ no esmalte do dente e a dentina. Esta variabilidade

de composição da HAp é a responsável pelas suas propriedades de alta biocompatibilidade e osteocondutividade (Heimann, 2013).

Devido a capacidade de incorporar vários materiais a partir da hidroxiapatita pode-se obter novos materiais, que apresentam potenciais aplicações nas áreas de odontologia, patologias ósseas (Arcos e Vallet-regi, 2013, Tran e Webster, 2011), luminescência (Liu *et al.*, 2014), catálise (Sheykhan *et al.*, 2011).

A hidroxiapatita (HAp) é portanto, das fases do fosfato de cálcio a mais atrativa para aplicações biomédicas devido à sua excelente biocompatibilidade, bioatividade, não toxicidade, biodegradação lenta, boa estabilidade mecânica, grande capacidade de absorção (Tan *et al.*, 2012; Noelia *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013; Yang *et al.*,2010; Zhang *et al.*, 2014; Cho *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014), área superficial e porosidade elevada (Pon-on *et al.*, 2011) e principalmente por sua semelhança com o osso humano natural (Wijesinghe *et al.*, 2014). Através da Figura 15 exibe-se a estrutura da hidroxiapatita.



Figura 15 - Estrutura da hidroxiapatita (Bicalho et al., 2008).

Os fosfatos de cálcio, representam um grupo de compostos que podem precipitar a partir de uma solução que contenha cálcio e fosfato. Esta precipitação de fosfatos de cálcio de um sistema, envolve várias fases de reação sólidas-líquidas, bem como a cinética de cristalização da espécie visando a pureza do produto formado (Vasenko e Qu, 2017).

Durante os processos de biomineralização, os organismos vivos são capazes de cristalizar e depositar uma ampla gama de minerais. Entre eles,

estão os fosfatos de cálcio que são produzidos em vertebrados não apenas nos ossos e dentes mas também (cálculo dentário, urinário pedras, lesões ateroscleróticas) calcificações de tecidos. Na Tabela 4, apresenta-se os tipos de fosfato de cálcio em função das fórmulas químicas e valores de solubilidade.

Ca/P	Nome	Símbolo	Fórmula	pKa 25 °C
0,5	Fosfato Monocálcico monohidrato	MCPM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	1,14
0,5	Fosfato Monocálcico anidro	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1,14
1,0	Fosfato dicálcio dihidratado (brushite)	DCPD	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	6,59
1,0	Fosfato dicálcico anidro (monetita)	DCPA	CaHPO₄	6,90
1,33	Fosfato de octacálcio	OCP	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	96,6
1,5	α-fosfato tricálcico	(α-TCP)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	25,5
1,5	β-fosfato tricálcico	(β-ΤϹΡ)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	28,9
1,2-2,2	Fosfato de cálcio amorfo	ACP	Ca _x (PO₄) _y ·nH₂O	-
1,67	Hidroxiapatita	HAp	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	116,8

Tabela 4 - Tipos de fosfatos de cálcio que variam em fórmulas químicas e valores de solubilidade.

Fonte: (Szcześ, Hołysz e Chibowski, 2017).

Entre os fosfatos de cálcio (CaPs) de razão molar (Ca/P = 0,5-2,0), a mais adequada para aplicação biomédica e de modo particular ortopédica é hidroxiapatita estequiométrica (HAp) de razão molar (Ca/P =1,67), devido a semelhança com a apatita, principal elemento do nosso osso natural (Chakraborty *et al.*, 2016; Miculescu *et al.*, 2017).

Assim, númerosos estudos têm sido feitos para determinar as condições de síntese da hidroxiapatita pura. A escolha do método de síntese é importante para garantir a obtenção de hidroxiapatita economicamente desejável, monofásica, nanocristalina de morfologia regular e incluem métodos secos que resultam em pós muito finos e homogêneos, porém estes métodos geralmente não permitem a obtenção de materiais com composição estequiométrica bem definida, além do difícil controle das condições de síntese e métodos úmidos (Yoruç e Aydinoğlu, 2017).

Os métodos mais amplamente reconhecidas utilizadas para produzir nano-hidroxiapatita sintética (nHAp) (Türk *et al.*, 2017) e incluem métodos secos que envolvem estados sólidos e mecânicos) 2) métodos úmidos envolvendo precipitação química (Mehta *et al.,* 2017), hidrólise, sol-gel (Ben-Arfa *et al.,* 2017), hidrotermal (Wang, Xue e Zhu, 2017), emulsão e sonoquímicos (Edralin *et al.,*2017); 3) processos de alta temperatura, incluindo combustão (Canillas *et al.,* 2017) e pirólise (Shi *et al.,* 2017); 4) síntese baseada em fontes hidrotermais biogênicas (Szcześ, Hołysz e Chibowski, 2017), síntese biomimética assistida por micro-ondas (Türk *et al.,* 2017).

Entre os métodos úmidos, de obtenção da hidroxiapatita o método por por precipitação consiste na neutralização à partir da reação entre hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] e ácido fosfórico [H₃PO₄]. O óxido de cálcio é obtido a partir da calcinação da calcita, à temperatura de aproximadamente 1100 °C e é posteriormente hidratado para a obtenção do hidróxido de cálcio (Bicalho *et al.,* 2008), de acordo com as equações abaixo:

$$CaCO_{3} \rightarrow CaO + CO_{2}$$
 (1)

$$CaO + H_2O \rightarrow Ca (OH)_2$$
⁽²⁾

 $10Ca(OH)_2 + 6H_3PO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18H_2O$

A reação de ajuste entre Ca(OH)₂ e H₃PO₄ desenvolve-se exotérmicamente com a liberação controlada de ânions de fosfato em água, em três estágios (dissolução de reagentes, nucleação de nova fase e cristalização dos produtos da reação). A mistura dessas duas soluções pode levar à precipitação de diferentes fases de fosfatos de cálcio, dependendo da quantidade de reagente e do pH da solução resultante (Miculescu *et al.,* 2017). Por meio da Tabela 5, evidencia-se os parâmetros de síntese da HAp. O controle de temperatura, pH da solução, cinética da reação são cruciais.

ŀ	Amostra	0-M	1-M	1.5-M	2-M	1-S	1.5-S	2-S
	Ca(OH) ₂ [g]	2	2	2	2	2	2	2
	H₃PO₄ [ml]	1.33	1.33	2	2.66	1.33	2	2.66
Parametro	Agitação magnética [2h]	Х	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark

Tabela 5 - Parâmetros de síntese da	a HAp p	por preci	pitação.
-------------------------------------	---------	-----------	----------

Fonte: Fonte: (Miculescu et al.,2017).

(3)

A hidroxiapatita porosa e nanocristalina, devido à sua não toxicidade e biocompatibilidade, é de grande interesse como sistema de administração e liberação controlada de fármaco. Como o ambiente gástrico é ácido pode degradar a HAp, ela tem sido usada principalmente como um sistema esquelético de administração de medicamentos em distúrbios ósseos (como osteoporose, tumores ósseos) em vez de sistemas terapêuticos orais (Szcześ e Hołysz, 2017).

Sistemas de administração com hidroxiapatita, requer uma morfologia especial que permite o carreamento de fármaco de alta capacidade. Com base nas propriedades da HAp, esta têm se destacado na obtenção de carreadores de fármaco por combinação com NPM's e/ou luminescentes conferindo ao carreador propriedades clínicas importantes para o diagnóstico e tratamento de doenças a exemplo da osteomielite (Bhattacharya *et al.*, 2013; Uskoković *et al.*, 2013).

A HAp com característica magnética tem sido usada, para aplicação como segmentação, separação e entrega de gene (Kai-Hui *et al.*, 2012; Zuo *et al.*, 2012), carreador de fármaco (Pon-on *et al.*, 2011; Sadighian *et al.*, 2014), extração em fase sólida de plasmídeos de DNA (Shan *et al.*, 2012), hipertermia no tratamento de câncer (Hou *et al.*, 2009), defeitos ósseos (Tran e Webster, 2011), como substitutos ósseos para melhorar a regeneração de tecidos (Panseri *et al.*, 2012b).

Portanto, a associação da HAp com NPM's têm mostrado excitantes e promissoras aplicações nos avanços da saúde e dos medicamentos, apresentando potencial aplicação como carreadores de fármaco para tratamento de várias enfermidades, principalmente aquelas relacionadas ao osso humano como por exemplo, a osteomielite.

2.8 Carreadores de Fármaco

Os carreadores de fármaco, são materiais utilizados para a liberação controlada de substâncias biologicamente ativas e apresentam como vantagens: i) a liberação localizada do fármaco em um compartimento particular do corpo, diminuindo, dessa forma, o nível sistêmico do fármaco; ii)

manutenção de níveis constantes do fármaco no organismo, implicando em uma eficiência maior na utilização do agente (ou seja, é necessário menor teor de fármaco para produzir o mesmo efeito que os sistemas convencionais); iii) preservação do fármaco que pode ser rapidamente destruídos pelo corpo (isso é particularmente importante para moléculas biologicamente sensíveis, tais como proteínas) e, iv) menor frequência de administração do agente ativo, aumentando o conforto do paciente e a eficácia do tratamento (Souza *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012b).

Os primeiros estudos realizados para a obtenção de sistemas carreadores eficazes tiveram como base o encapsulamento de moléculas. O primeiro estudo data do início do século XX, quando Paul Ehrlich propôs o seu modelo, que ficou conhecido por "Bala Mágica de Ehrlich" *(Ehrlich's Magic Bullet)*. Hoje, seguindo a mesma ideia, existem sistemas carreadores, como lipossomas, niossomas, aquassomas, transferssomas, nanocáspulas, microcápsulas, ciclodextrinas, nanopartículas poliméricas, microesponjas, nanopartículas inteligentes entre outros (Henrique *et al.*, 2006, Bergmann, 2008).

Ao se tratar de sistemas carreadores, como NPM's este deve ser pequeno (menor que 100 nm), não tóxico, biodegradável, biocompatível, não agregar, não deve promover a opsonização com células fagocitárias, (opsonização são proteínas, tais como imunoglobulinas ou proteínas do complemento que se liga a micróbios e substâncias estranhas e são absorvidas pelas células fagocitárias do sistema retículo endotelial) (Naahidi *et al.*, 2013), apresentar tempo de circulação prolongado no organismo, rentável e não ser inflamatório (Aguilar, 2013).

Neste sentido, a viabilidade e eficácia da segmentação magnética do carreador de fármaco dependem tanto do tempo de circulação do fármaco na corrente sanguínea, quanto do campo magnético externo que deve exercer força magnética suficiente em relação às forças hidrodinâmicas do fluxo de sangue sobre o carreador, para levar o fármaco ao alvo (Plank *et al.*, 2011).

A este respeito, as NPM's se destacam em aplicações como carreador de fármaco e determina como o fármaco pode ser concentrado e mantido em dado local por meio de um campo magnético externo. Isto permite que alta dose do fármaco seja entregue no alvo desejado minimizando a exposição dos tecidos ou órgãos saudáveis a seus efeitos secundários (Tiefenauer, 2007, Sadighian *et al.*, 2014) minimizando a citotoxicidade e aumentado à interação entre o fármaco e o alvo de interesse.

Carreadores de fármaco magnéticos, consistem portanto, na atração do carreador magnético por um campo magnético externo. Onde, uma força de magnética externa é capaz de "prender" e difundir o fármaco no alvo por ação da vibração das NPM's que gera calor. Para tanto, a obtenção de carreadores magnéticos eficazes, dependem das propriedades magnéticas, tamanho das NPM's, geometria do campo magnético, assim como parâmetros fisiológicos, como profundidade do alvo, taxa do fluxo sanguíneo, suprimento vascular e o peso corporal. Na Figura 16, apresenta-se, de forma ilustrativa um carreador de fármaco magnético para o tratamento da osteomielite.





O fármaco deve portanto, ligar-se a um transportador (carreador), que deve ter potencial efeito farmacodinâmico (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinético (controle da absorção e distribuição tecidual) e contornar os efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica) dos mesmos (Henrique *et al.*, 2006).

Quanto ao mecanismo de transporte dentro do corpo, o carreador de fármaco pode ser transportado, por ingestão oral ou intravenosa (Naahidi *et al.,*

2013). A ingestão do fármaco via intravenosa envolve três fases: primeiro a circulação sistêmica e interação do sistema reticulo endotelial (RES), a segunda fase de distribuição do fármaco e o extravasamento da corrente sanguínea e retenção no alvo e a terceira fase envolve a penetração do fármaco no alvo e sua posterior liberação (Ernsting *et al.*, 2013).

No caso dos biomateriais cerâmicos, usados como como carreador de fármaco na forma de implantes, estes podem ser classificados de acordo com a sua interação com o tecido hospedeiro como: bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis. Na Tabela 6, apresenta-se os materiais mais reportados pela comunidade cíentifica que têm sido usados como carreadores, capazes de liberar o fármaco (antibiótico) no local e os microorganismos em que estes foram testados.

Material utilizadoAntibióticoMicrorganismos testados/AnimalFosfato de cálcio biocerâmicoGentamicinaS. aureus/ coelhosFosfato de b-tricálcio Sulfato de cálcioGentamicinaS. aureus/ratoSulfato de cálcioMoxifloxacina MoxifloxacinaMRSA/coelhosSulfato de cálcioSulfato de tobramicina Osteomielite crônicaHumanoSulfato de cálcioSulfato de tobramicina Osteomielite crônicaHumanoSulfato de cálcioSulfato de tobramicina Osteomielite crônicaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaCeftriaxona-sulbactam CompostoS. aureus/coelhosNano particulas de hidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/ratosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosVancomicinaS. aureus/ratosMaterial utilizadoGentamicinaS. aureus/ratosPoli (ácido d, I-lactido) (PDLLA)GentamicinaS. aureus/coelhosPoli-alcanoatoSulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosPoli-alcanoatoGentamicinaS. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poligicólicoGentamicinaS. aureus/coelhosPoliglicólico P (SA-RA)GentamicinaS. aureus/caesP (SA-RA)GentamicinaS. aureus/caes	Classe - Biocerâmicas				
Fosfato de cálcio biocerâmicoGentamicinaS. aureus/ coelhosFosfato de b-tricálcioGentamicinaS. aureus/ratoSulfato de cálcioMoxifloxacinaMRSA/coelhosSulfato de cálcioSulfato de tobramicina Osteomielite crónicaHumanoSulfato de cálcioSulfato de tobramicina Osteomielite crónicaHumanoSulfato de cálcioSulfato de tobramicina Osteomielite crónicaHumanoSulfato de cálcioSulfato de tobramicina Ceftriaxona-sulbactam CompostoS. aureus/coelhosNano particulas de hidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaSulfato de gentamicina VancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaSulfato de gentamicina VancomicinaS. aureus/coelhosClasse - PolímerosClasse - PolímerosMaterial utilizadoAntibióticoMicrorganismos testados/AnimalPoli (ácido d, I-lactido) (PDLLA) Colageno PEG, PLGAGentamicina Tobramicina, Cefazolin ampicilinaS. aureus/coelhosPoli-alcanoatoSulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosÁcido polijático, ácido poligicólico P (SA-RA)GentamicinaS. aureus/cães S. aureus/ratos	Material utilizado	Antibiótico	Microrganismos testados/Animal		
Fosfato de b-tricálcioGentamicinaS. aureus/ratoSulfato de cálcioMoxifloxacinaMRSA/coelhosSulfato de cálcioSulfato de tobramicinaHumanoSulfato de cálcioSulfato de tobramicinaS. aureus/coelhosSulfato de cálcioSulfato de tobramicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaCeftriaxona-sulbactam CompostoS. aureus/coelhosNano particulas de hidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaSulfato de gentamicinaS. aureus/ratosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/ratosMaterial utilizadoAntibióticoMicrorganismos testados/AnimalPoli (ácido d, I-lactido) 	Fosfato de cálcio biocerâmico	Gentamicina	S. aureus/ coelhos		
Sulfato de cálcioSulfato de tobramicina Osteomielite crônicaHumanoSulfato de cálcioSulfato de tobramicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaCeftriaxona-sulbactam CompostoS. aureus/coelhosNano particulas de hidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosClasse - PolímerosClasse - PolímerosMaterial utilizadoAntibióticoMicrorganismos 	Fosfato de b-tricálcio Sulfato de cálcio	Gentamicina Moxifloxacina	<i>S. aureus/</i> rato MRSA/coelhos		
Sulfato de cálcioSulfato de tobramicina Ceftriaxona-sulbactam CompostoS. aureus/coelhosNano particulas de hidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaSulfato de gentamicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaSulfato de gentamicinaS. aureus/ratosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/ratosMaterial utilizadoAntibióticoMicrorganismos testados/AnimalPoli (ácido d, I-lactido) (PDLLA)GentamicinaS. aureus/coelhosPeli, (Acido d, I-lactido) (PDLLA)GentamicinaS. aureus/coelhosPoli-alcanoatoSulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poliglicólico P (SA-RA)GentamicinaS. aureus/coelhosS. aureus/caesS. aureus/coelhos	Sulfato de cálcio	Sulfato de tobramicina Osteomielite crônica	Humano		
HidroxiapatitaCeftriaxona-sulbactam CompostoS. aureus/coelhosNano particulas de hidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaSulfato de gentamicinaS. aureus/ratosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosMaterial utilizadoClasse - PolímerosMicrorganismos testados/AnimalPoli (ácido d, I-lactido) 	Sulfato de cálcio	Sulfato de tobramicina	S. aureus/coelhos		
Nano particulas de hidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaS. aureus/coelhosHidroxiapatitaSulfato de gentamicinaS. aureus/ratosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosHidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosMaterial utilizadoClasse - PolímerosMaterial utilizadoAntibióticoMicrorganismos testados/AnimalPoli (ácido d, I-lactido) (PDLLA)GentamicinaS. aureus/ratosColagenoGentamicinaS. aureus/coelhosPEG, PLGATobramicina, CefazolinS. aureus/coelhosPoli-alcanoatoSulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poliglicólicoGentamicinaS. aureus/coelhosP (SA-RA)GentamicinaS. aureus/caes	Hidroxiapatita	Ceftriaxona-sulbactam Composto	S. aureus/coelhos		
Hidroxiapatita HidroxiapatitaVancomicina Sulfato de gentamicina VancomicinaS. aureus/coelhos 	Nano particulas de hidroxiapatita	Vancomicina	MRSA/coelhos		
Hidroxiapatita HidroxiapatitaSulfato de gentamicina VancomicinaS. aureus/ratos MRSA/coelhosClasse - PolímerosClasse - PolímerosMaterial utilizadoAntibióticoMicrorganismos 	Hidroxiapatita	Vancomicina	S. aureus/coelhos		
HidroxiapatitaVancomicinaMRSA/coelhosClasse - PolímerosMicrorganismos testados/AnimalMaterial utilizadoAntibióticoMicrorganismos testados/AnimalPoli (ácido d, I-lactido) (PDLLA) Colageno PEG, PLGAGentamicina Gentamicina, Cefazolin Sulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhos S. aureus/coelhosPoli-alcanoatoSulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhos S. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poliglicólico P (SA-RA)GentamicinaS. aureus/caes S. aureus/caes	Hidroxiapatita	Sulfato de gentamicina	S. aureus/ratos		
Classe - PolímerosMaterial utilizadoAntibióticoMicrorganismos testados/AnimalPoli (ácido d, I-lactido) (PDLLA)GentamicinaS. aureus/ratosColageno PEG, PLGAGentamicinaS. aureus/coelhosPoli-alcanoatoTobramicina, Cefazolin Sulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poliglicólico P (SA-RA)GentamicinaS. aureus/coelhos	Hidroxiapatita	Vancomicina	MRSA/coelhos		
Material utilizadoAntibióticoMicrorganismos testados/AnimalPoli (ácido d, I-lactido) (PDLLA) Colageno PEG, PLGAGentamicinaS. aureus/ratosPoli-alcanoatoGentamicina, Cefazolin Sulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poliglicólico P (SA-RA)GentamicinaS. aureus/coelhos		Classe - Polímeros			
Poli (ácido d, I-lactido) (PDLLA)GentamicinaS. aureus/ratosColagenoGentamicinaS. aureus/coelhosPEG, PLGATobramicina, CefazolinS. aureus/coelhosPoli-alcanoatoSulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poliglicólicoGentamicinaS. aureus/coelhosP (SA-RA)GentamicinaS. aureus/caes	Material utilizado	Antibiótico	Microrganismos testados/Animal		
ColagenoGentamicinaS. aureus/coelhosPEG, PLGATobramicina, CefazolinS. aureus/coelhosPoli-alcanoatoSulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poliglicólicoGentamicinaS. aureus/coelhosP (SA-RA)GentamicinaS. aureus/caes	Poli (ácido d, l-lactido) (PDLLA)	Gentamicina	S. aureus/ratos		
PEG, PLGATobramicina, CefazolinS. aureus/coelhosPoli-alcanoatoSulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poliglicólicoGentamicinaS. aureus/caesP (SA-RA)GentamicinaS. aureus/ratos	Colageno	Gentamicina	S. aureus/coelhos		
Poli-alcanoatoSulbactam, cefoperazona, ampicilinaS. aureus/coelhosÁcido polilático, ácido poliglicólicoGentamicinaS. aureus/cãesP (SA-RA)GentamicinaS. aureus/ratos	PEG, PLGA	Tobramicina, Cefazolin	S. aureus/coelhos		
Acido polilático, ácido poliglicólicoGentamicinaS. aureus/cãesP (SA-RA)GentamicinaS. aureus/ratos	Poli-alcanoato	Sulbactam, cefoperazona, ampicilina	S. aureus/coelhos		
P (SA-RA) Gentamicina S. aureus/ratos	Ácido polilático, ácido poliglicólico	Gentamicina	S. aureus/cães		
	P (SA-RA)	Gentamicina	S. aureus/ratos		

Tabela 6 - Carreadores de fármaco para liberação no local.

Fonte: (Nandi *et al.*, 2016).

Classe - Vidro bioativo				
Material utilizado	Antibiótico	Microrganismos testados/Animal		
Borato de vidro bioativo (BBG)	Gentamicina	Escherichia coli/coelho		
Borato de Vidro	Vancomicina	MRSA/coelhos		
Biovidro	SACO, S53P4	MRSA e S. epidermidis, P.aeruginosa e Acinetobacter Baumannii/humano		
Borato de vidro bioativo (BBG)	Teicoplanin	MRSA/coelho		
Borató Boro-silicato	Vancomicina Ceftriaxona-sulbactam	MRSA/coelhos S. aureus/coelhos		
	Classe - Compósitos			
Material utilizado	Antibiótico	Microrganismos testados/Animal		
Nano-hidroxiapatita / colagénio / cálcio sulfato hemi hidrato (NHAc/CSH)	Vancomicina	Osteomielite crônica/ coelhos		
Quitosana, vidro borato	Teicoplanin	S. aureus/ coelhos		
Vidro bioativo ligado ao borato-quitosana	Vancomicina	MRSA/ coelhos		
PLGA, vidro bioativo	Ciprofloxacino	S. aureus, S. epidermidis, E. coli, P. aeruginosa/ coelhos		
Poli (D, L-lactido), tricálcio-fosfato, Hidroxiapatita	Ciprofloxacino	S. aureus/ coelhos		
Poli-caprolactona e fosfato tricálcico	Gatifloxacino	S. milleri,B. fragilis/ coelhos		

Fonte: (Nandi *et al.*, 2016).

De modo particular, as cerâmicas bioativas como a hidroxiapatita porosa ou HAp associada a outros materiais, a exemplo das NPM's permite sua aplicação como carreador de fármaco na área afetada, sendo usada principalmente para administrar diretamente antibióticos em tecidos duros, ossos acometidos de osteomielite. A liberação local e sustentada do fármaco permite portanto, encurtar as terapias prolongadas e pode acelerar o processo de cicatrização óssea, além de minimizar a extensão da remoção cirúrgica do osso afetado estimulando a cura e evitando consequentemente o aumento da mortalidade e elevados custos econômicos e sociais.

2.9 Osteomielite

A raiz da palavra osteon (osso) e mielo (medula) são combinadas comite (inflamação) para definir o estado clínico em que o osso é infectado com microrganismos. É uma doença heterogênea em sua fisiopatologia, apresentação clínica, e gestão. Apresenta-se inicialmente com febre, dor local, e sensibilidade que, quando deixado sem tratamento, podem resultar em necrose e morte do osso. O diagnóstico clínico nos estágios finais é conseguido com facilidade. Entretanto, um diagnóstico precoce imediato é preciso, porém desafiador, e pode determinar a morbidade e extensão da infecção (Pineda *et al.*, 2006; Bhat e Gupta, 2014; Waeiss *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2014).

O termo osteomielite engloba um amplo grupo de doenças infecciosas, caracterizado por uma infecção do osso e/ou medula óssea. A patogênese dessa doença pode seguir aguda, subaguda ou crônica e envolve uma série de fatores do hospedeiro e do patógeno contributivos. A classificação etiológica comumente usada distingue três tipos de osteomielite hematogênica: i) doença aguda ou crônica semeado por organismos na corrente sanguínea, ii) disseminação local de uma fonte contígua de infecção e iii) osteomielite secundária relacionada com insuficiência vascular ou insuficiência neurológica associada (Roy *et al.*, 2012; Birt *et al.*, 2017).

A osteomielite hematogênica dos ossos longos, geralmente afeta a metáfise. O atraso no fluxo sanguíneo nos laços vasculares na metáfise perto das placas epífises conduz à deposição de micróbios e ao estabelecimento da infecção. Uma resposta inflamatória resulta de um aumento da pressão no osso medular. Esta pressão faz com que a infecção atravesse o córtex e, se não for controlada, em última análise, através do periósteo. Isso pode levar à diminuição do fornecimento de sangue ao periósteo com necrose óssea. Peças de osso necrótico podem se separar e são chamadas de seqüestro, que pode conter pus. Novo osso pode começar a se formar sobre o periósteo lesionado; Isso é conhecido como um involucrum e pode envolver parcialmente um seqüestro com drenagem contínua (Schmitt, 2017; Hwang *et al.*, 2017).

A osteomielite vertebral, surge de forma mais comum da deposição

hematógena de micróbios na metáfise dos corpos vertebrais. A infecção então se espalha para o disco intravertebral, que é uma estrutura avascular. Os padrões comuns de infecção são muitas vezes explicados por estruturas vasculares, com disseminação entre as artérias comunicantes intramedulares às metafíses de uma única vértebra e envolvimento de corpos vertebrais adjacentes fornecidos por artérias de uma única artéria vertebral.

Através da Figura 17, ilustra-se o diagrama que mostra três categorias de osteomielite. (A e B) A disseminação hematogênica primária (transmitida pelo sangue) das bactérias afeta principalmente os corpos vertebrais em todas as idades ou a metáfise de pacientes esqueleticamente imaturos. (C e D) A infecção óssea contigua é mais comumente vista com contaminação direta de bactérias em fraturas abertas ou cirurgia de substituição articular com implantes protéticos. (E) A osteomielite associada à doença vascular ou neurológica afeta mais frequentemente a extremidade inferior.



Figura 17 - três categorias de osteomielite (A e B) A disseminação hematogênica primária (transmitida pelo sangue). (C e D) A infecção óssea contigua é mais comumente vista com contaminação direta de bactérias em fraturas abertas ou cirurgia de substituição articular com implantes protéticos. (E) A osteomielite associada à doença vascular ou neurológica afeta mais frequentemente a extremidade inferior. (Birt *et al.*, 2017).

A osteomielite, pode afetar qualquer osso do corpo, e não é limitado por

sexo ou idade. Crianças que sofrem de osteomielite são frequentemente afetadas no fêmur, no osso da coxa, ou no osso da perna (tíbia), bem como ossos encontrados no braço. Adultos que sofrem de osteomielite na maioria das vezes sofrem infecção no osso da pélvis ou da coluna vertebral (Nadeem *et al.*, 2010). A osteomielite pode se espalhar pela via hematogênica (observada principalmente em crianças), propagação pós-traumática ou contígua (comum em adultos). A maioria das osteomielites envolvem ossos longos, coluna vertebral e ossos dos pés (Bhat e Gupta, 2014).

Esta inflamação no osso é causada, sobretudo por bactérias, como *Staphylococcus aureus* (Wong *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2013) sendo o organismo causador predominante *Haemophilus influenzae* e *estreptococo do grupo B* (Williams *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2001) são causas comuns em crianças; bactérias gram-negativas (como *E. coli*) (Park *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014), no adulto e diabético; *Staphylococcus epidermidis* em usuários de drogas intravenosas e pacientes com próteses. Os vírus, fungos e protozoários também são reconhecidos como organismos causadores particularmente em pacientes imunocomprometidos (Bhat e Gupta, 2014).

Na Figura 18, exibe-se a descarga suprativa drenada do abscesso subcutâneo após incisão do abscesso ósseo de osteomielite causada por *Staphylococcus aureus*. Por meio da qual, observa-se 2 pequenos orifícios onde a epífise distal da tíbia foi curetada e irrigada. A ferida foi fechada sobre um tubo de drenagem que foi deixado no local por 48 horas.



Figura 18 - O córtex medial do maléolo (parte distal da tíbia) revela a presença de 2 defeitos líticos corticais (Hwang *et al.*, 2017).

A estrutura do laço vascular na metáfise adjacente à placa de crescimento e do fluxo sanguíneo lento associado, permite que as bactérias se assentem com mais facilidade na metáfise do que em outros sítios e, portanto, contribuem para o desenvolvimento de osteomielite. A presença de uma diminuição na defesa do hospedeiro na metáfise, devido à falta do sistema reticuloendotelial em comparação com outros locais de ossos longos também são responsáveis pela osteomielite (Hwang *et al.*, (2017). Por meio da Figura 19, apresenta-se culturas retiradas da ferida do exame histopatológico do osso exibido na Figura 18, do líquido articular intra-operatório da osteomielite aguda.



Figura 19 - Aparência histopatológica de osso sugerindo osteomielite supurativa aguda. (A) Perda de trabéculas espongosas típicas e coleções embaladas de células inflamatórias na medula (hematoxilina e mancha de eosina [H & E], ampliação original × 100). (B) Infiltrações densas de neutrófilos e trabéculas irregulares destruídas irregularmente (hematoxilina e mancha de eosina [H & E], ampliação original × 400) (Hwang *et al.*, (2017).

Osteomielite aguda é de início uma doença rápida, mais comum em crianças e afeta principalmente a metáfise de ossos longos, como a tíbia, fêmur e úmero. A infecção provoca uma resposta inflamatória que leva ao aumento da pressão intramedular responsável pela trombose dos vasos. Isto faz com que a progressão da infecção e propagação do exsudado provoque a remoção do periósteo e formação de novo osso (também conhecido como invólucro). A infecção também pode causar desvasculação e morte do osso podendo formar a fístula e abscesso do tecido mole (Bhat e Gupta, 2014; Mpalaris *et al.*, 2014; Jain *et al.*, 2012; Tafin-Kampé e Kamsu-Foguem, 2013; Barriocanal *et al.*, 2013).

Osteomielite subaguda é de início insidioso e mais difícil de diagnosticar por causa de sintomas leves e falta de reação sistêmica. Muitas vezes pode imitar outras condições benignas e malignas do tumor ósseo ser mais comum. Abscesso de Broadie é um tipo de osteomielite subaguda é particularmente comum em crianças, geralmente meninos e tende a envolver a metáfise de ossos longos, especialmente as extremidades distais metafisários ou proximal da tíbia (Marui *et al.*, 2002; Flensborg *et al.*, 2013; Schmidt e Townsend, 2008; Bhat e Gupta, 2014).

Osteomielite crônica, muitas vezes surge de uma osteomielite aguda inadequadamente tratada, trauma anterior ou procedimentos ortopédicos. Na osteomielite crônica o osso longo afetado demonstra afinamento cortical focal com pequenos cistos intramedulares (Bhat e Gupta, 2014; Cimolai, 2011).

A osteomielite caracteriza-se pela presença de dor, edema e supuração. Os sintomas podem ser severos ou ligeiros, dependendo da duração dos sintomas de vários fatores, entre eles, virulência do patógeno, presença de doença subjacente e estado imunitário do indivíduo. Radiograficamente é possível observar um padrão osteolítico de reabsorção óssea como apresentado na Figura 20. Em termos histológicos, o osso infectado vai sendo substituído por células com componente inflamatório como leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e ainda células plasmáticas. Os osteoblastos são destruídos e a trabécula óssea vai sendo reabsorvida pelos osteoclastos (Schoen *et al.*, 2009).



Figura 20 - Tomografia computadorizada de uma mandíbula (corte axial), com presença de osteomielite de origem bacteriana (Suei *et al.*, 2005).

Segundo alguns autores, existem diversos fatores de risco para a ocorrência de osteomielite, nomeadamente presença de infecções alveolares (no caso de extração dentária), alta exposição à radiação, uso de bifosfanatos,

tabagismo, consumo crônico de álcool, diabetes incontrolada e alguns estados de imunossupressão. O tratamento inclui a administração de antibióticos, podendo ser necessário realizarem desdobramento cirúrgico da área afetada. Na maioria dos casos os sintomas regridem completamente ao fim de 3 meses (Suei *et al.*, 2005).

Avanços na terapia antimicrobiana melhora o potencial de cura e, ao mesmo tempo, promove o desenvolvimento de organismos cada vez mais resistentes (Koorbusch *et al.*, 2011). A infecção da medula óssea ou de osso é uma condição difícil de tratar e, apesar dos avanços no processamento de imagens é um desafio para detectar e diagnosticar precocemente (Mpalaris *et al.*, 2014).

O tratamento, quando instituído precocemente aumenta significativamente a taxa de cura e reduz complicações e morbidade associada (Mcnally e Nagarajah, 2010). A importância do seu estudo resume-se a vários pontos importantes: é uma infecção de propagação muito rápida e que põe em risco a vida do paciente; a destruição óssea decorrente pode ser muito extensa e tende a cronificação, exigindo rapidez e precisão no diagnóstico e precocidade no tratamento (Lima *et al.*, 2014 e Smith *et al.*, 2002). Na Figura 21, são evidenciadas radiografias de joelho que evidenciam áreas de osteomielite para uma lesão lítica na tíbia típica superior.



Figura 21 - Radiografias do joelho: as setas apontam para uma lesão lítica na tíbia típica superior (A) a ressonância magnética ponderada em T1 com contraste mostra a área de osteomielite (B) (Calhoun *et al.*, 2005).

Transportadores biodegradáveis foram introduzidos na cirurgia ortopédica para a profilaxia da osteomielite pós-operatória e no tratamento de osteomielite crônica. Por exemplo, o poli (D, L-lactídeo) foi utilizado na liberação controlada do fármaco pefloxacina para o tratamento da osteomielite em coelhos, alcançando a erradicação total da bactéria MRSA (*Staphylococcus Aureus* resistente à Meticilina) causadora da osteomielite (Huh e Kwon, 2011).

Em contraste, esses polímeros geram subprodutos ácidos que, em alguns casos podem gerar erosão superficial por degradação enzimática, proporcionando elevadas taxas de liberação dos antibióticos. Assim, vários tipos de biocerâmicas, principalmente as de fosfato de cálcio (por exemplo, a hidroxiapatita sintética e o fosfato tricálcico), têm sido amplamente estudados para aplicações como carreador de fármaco, pelo fato de não só entregar localmente o fármaco (no caso específico da osteomielite, antibióticos), mas também contribuir significativamente para o processo de regeneração do osso, como já demonstrado em estudos do tratamento de implantes associados à osteomielite crônica em coelhos (Barros, 2012; Lima, 2013).

Muitos testes, no tratamento da osteomielite têm sido relatados nos últimos anos, utilizando-se antibióticos adequadamente concebidos em todas as fases do tratamento da doença, embora o objetivo da terapia possa variar em diferentes estágios da infecção. A consideração mais importante para a seleção de antibióticos é o espectro de ação. Via de administração por via intravenosa ou por via oral é menos importante do que os níveis de fármaco que são realizáveis no local da infecção. Terapia parenteral ambulatorial e uso de agentes orais tem simplificado a entrega de fármaco e o tratamento a longo prazo (Fraimow *et al.*, 2009; Schmitt, 2017). Na Tabela 7, evidencia-se o perfil de dessorção de antibióticos em carreadores de fármaco usados no tratamento da osteomielite.
Antibióticos	Carreadores	Concentração máxima do antibiótico	Concentração máxima	Pico	Duração
Rifampicina	Cimento ósseo acrílico	10 %	15 mg/mL	3 dias	>30 dias
Moxifloxacina	Cimento ósseo acrílico	10 %	25 mg/mL	4 dias	>30 dias
Daptomicina	Cimento ósseo acrílico	10 %	8–9 mg/mL	3-4 dias	>30 dias
Cefotaxime	Cimento ósseo acrílico	10 %	13 mg/mL	1º dia	>30 dias
Gentamicina	Cimento ósseo acrílico	10 %	10 mg/mL	3º dia	>30 dias
Vancomicina	Cimento ósseo acrílico	10 %	32 mg/L	1º dia	>30 dias
Ertapenem	Cimento ósseo acrílico	10 %	13 mg/mL	3º dia	>30 dias
Meropenem	Cimento ósseo acrílico	10 %	13 g/mL	1-2° dias	>30 dias
Cefotaxima	Cimento ósseo acrílico	10 %	<2 mg mg/mL	2º dia	8–9 dias
Ampicilina	Cimento ósseo acrílico	10 %	<2 mg mg/mL	2 h	< 5 dias
Meropenem	Cimento ósseo Simplex	10 %	57,83 ± 7.45 μg/mL	1 h	20 dias
Cefazolin	Sulfato de cálcio	1 g de Cefazolin	>1000 µg/mL	1º dia	>15 dias
Penicilina	Fosfato de β-tricálcico-silicato- xerogel	nd*	199,5 µg	1º dia	91 dias
Tobramicina	Cimento ósseo PMMA	nd*	4 ppm	1º dia	>9 dias
Ciprofloxacino	nd*	nd*	74,5 mg/L	1º dia	28- 360 dias
Clindamicina	nd*	nd*	407 mg/L; 80,8 µg/mL	1º dia	28 dias
Kanamicina	nd*	nd*	12,5 µg	1º dia	8 dias
Cefazolin	nd	nd*	250 mg/L	1º dia	28 dias

Tabela 7 - Perfil de dessorção de antibióticos em carreadores de fármaco usados no tratamento da osteomielite.

Fonte: (Nandi et al., 2016)

A terapia antimicrobiana efetiva constitui portanto, o padrão para o sucesso no tratamento da osteomielite. No entanto, a resposta clínica aos agentes antimicrobianos permanece sempre indescritível devido a inúmeros fatores como baixa penetrabilidade do fármaco que impede o medicamento de atingir o nível de concentração inibitória mínima prolongada (MIC) no tecido ósseo durante a terapia. A recuperação clínica bem sucedida também ocorre por drenagem cirúrgica e desbridamento, tornando a intervenção médica mais complicada e propensa a infecção. A maior parte da terapia oral da osteomielite é realizada com fármaco de fluoroquinona. Entre as fluroquinonas, a ciprofloxacino, o moxifloxacino e a levofloxacina são mais comumente usadas para esse fim e são estudados extensivamente por sua cinética e distribuição em ossos, onde a taxa de cura pode atingir até 60-80% com o uso desses medicamentos. No entanto, a terapia oral resulta em uma dose continuada por 12-16 semanas, sendo muito alta (Nandi *et al.*, 2016).

Entre os antibióticos dispostos na Tabela 7, foi dado ênfase nesta tese aos carreadores da ciprofloxacino e mais especificamente o genérico ciproflonax para o tratamento da osteomielite. O ciproflonax tem como princípio ativo o cloridrato de ciprofloxacino (ácido 3-quinolino-1-ciclopropil-6-flúor-1,4dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil) carboxílico), e apresenta fórmula molecular C₁₇H₂₁CIFN₃O₄, massa molar de 385,818 Dalton, ponto de fusão experimental de 314 °C e solubilidade experimental de 3,5 g/100 mL, solúvel em água (The Merck Index, 2006). A fórmula estrutural do cloridrato de ciprofloxacino é evidenciada na Figura 22.



Figura 22 - Fórmula estrutural do fármaco cloridrato de ciprofloxacino (The Merck Index, 2006).

Na Tabela 8, apresenta-se a concentração óssea da ciprofloxacino que atinge uma concentração óssea apreciável no tratamento da osteomielite.



Fármaco	Dose	C _{max} (h)	t _{1/2}	Ligação proteica	Vd	Liberação e metabolismo do fármaco	Concentração sérica	Concentração óssea
Ciprofloxacin	a 200 mg IV		4–6 h	20–40%	78,41 ± 13,17 L em Pacientes idosos	50-70% através da urina como Fármaco não metabolizado e 10% como Metabolito; 18,39 ± 4,15 L /h Liberação em pessoas idosas	1< cerca de 4 mg / kg	1-3 mg/kg (osso do crânio); 2 mg μg/g (medular); 1,4 mg μg / g (cortical)

Fonte: (Nandi et al., 2016).

Entretanto, outros autores também estudaram a ciprofloxacino, e relataram estudos *in vitro* e *in vivo* deste fármaco em carreadores de fármaco, entre estes, pode-se destacar os estudos feitos por: Wu *et al.*, (1997), desenvolveram um sistema de carreamento de fármaco (cápsula), constituído pelo fármaco ciprofloxacino e pelo fosfato tricálcico. O sistema foi diluído e incubado numa solução padrão. Estudos *in vitro* evidenciaram que o carreador mostrou boa biocompatibilidade e tempo de degradação progressiva, mantendo alto nível de liberação de ciprofloxacino a longo prazo. Em que, a irradiação de ultra-sons na terapia física aumentou a quantidade de liberação de fármaco a partir CTDC (P <0,02), sendo uma nova técnica para alcançar o controle da liberação do fármaco ciprofloxacino.

Ramchandani e Robinson, (1998) reportaram o desenvolvimento do sistema de entrega biodegradável, implantável contendo cloridrato de ciprofloxacino/poli (L-ácido lático-co-ácido glicólico), PLGA, nas concentrações de 50:50 na forma de microcápsulas (comprimidos) preparadas usando dois sistemas o não-solvente e o solvente (cloreto de metileno-hexano (não polar) e tampão de fosfato-acetona (polar) para o tratamento local da osteomielite e para estudar o grau de penetração do fármaco a partir do local de implantação no osso. A extensão da penetração do fármaco a partir do local do implante foi estudado usando coelhos. Os resultados obtidos *in vitro* ilustraram que a liberação do fármaco a partir de implantes produzidos pelo método não polar se deu de forma mais rápida em comparação com implantes feitos pelo método

polar. A liberação de cloridrato de ciprofloxacino nos implantes foi bifásica em 20% w/w do carreamento do fármaco e monofásico e 35% w/w. Os estudos in vivo indicaram que os implantes de PLGA na concentração de 50:50 foram quase completamente reabsorvidos no prazo de cinco a seis semanas. Onde os níveis do fármaco foram superiores a concentração inibitória mínima (MIC) de ciprofloxacino, até 70 mm do local de implante, por um período de seis semanas sendo eficaz no tratamento da osteomielite.

Ogawa e Plepis (2001), reportaram a obtenção de compósitos de hidroxiapatita:colágeno em diferentes proporções, 5:1, 10:1, 15:1 e 20:1 (m/m). A incorporação 5% de cloridrato de ciprofloxacino em massa no compósito foi realizada no momento de preparo ao compósito HAp:colágeno. Foi utilizado colágeno submetido a tratamento alcalino durante (24 e 48h) e a melhor proporção HA:col obtida foi de 10:1 (m/m), utilizada para incorporação e liberação de ciprofloxacino. Os experimentos de liberação in vitro foram realizados em solução salina tampão de (PBS), pH 7,4, a 37 °C, mostrando uma liberação máxima em torno de 90% para HA:col em 24 h e 75 % para HA:col em 48h, após 10h de imersão. A liberação de ciprofloxacino dos compósitos é controlada pelos poros da matriz, sendo que a liberação foi mais rápida nas primeiras horas de imersão, o que impede uma concentração muito baixa do medicamento no sítio de ação no início do tratamento de uma infecção. Os resultados indicam que os diferentes tempos de tratamento alcalino no colágeno afetaram a liberação de antibiótico. Uma diferença na quantidade de cargas negativas nos colágenos de 24 e 48h provocou uma diferente interação entre o compósito e o antibiótico.

Huneault *et al.*, (2004) avaliaram a prevenção e eficiência de implantes de amido reticulado de alto teor de amilose como matriz do cloridrato de ciprofloxacino em trinta e dois cães inoculados com a inserção femoral de um parafuso inoculados com *Staphylococcus aureus* e foram, então, divididos aleatoriamente em quatro grupos: (A) prevenção com implantes ciprofloxacino-CLHAS, (B) desbridamento cirúrgico (controle positivo), (C) desbridamento cirúrgico e tratamento com ciprofloxacino oral e (D) desbridamento cirúrgico e tratamento com amido reticulado de alto teor de amilose como matriz do cloridrato de ciprofloxacino (implantes in situ ciprofloxacin-CLHAS). Na 4 semana a osteomielite foi confirmada, e os respectivos tratamentos iniciados para os grupos B, C e D. Fémures do grupo preventivo (A) apresentaram-se quase normais. Cães de ambos os grupos de tratamento com ciprofloxacino C e D apresentaram melhor cicatrização óssea, reação periosteal e menor mobilidade quando comparados com os cães do grupo B. Erradicação da infecção foi observada em locais proximais/distais em B: 25 %/12%, C: 37%/ 62 % e D: 62%/75%. Ambos os grupos tratados com ciprofloxacino tiveram suas radiografias melhoradas da quarta a décima semana. Os dados menos severos nos cães dos grupos C e D em relação ao grupo B sugerem que os implantes ciprofloxacino-CLHAS biodegradáveis são eficazes para a prevenção e tratamento de osteomielite.

3 METODOLOGIA

A metodologia proposta para realização desta tese será descrita em três etapas, para maior clareza e entendimento da mesma. A primeira etapa, consiste na obtenção e caracterização das nanopartículas magnéticas (NPM's) de Fe₃O₄ e CoFe₂O₄; da hidroxiapatita (HAp); do fármaco e dos híbridos NPM's@SiO₂. A segunda etapa, consiste na obtenção dos compósitos híbridos NPM's@SiO₂:HAp, e NPM's@SiO₂:HAp/γ. Na terceira etapa, serão feitos os estudos dos ensaios *in vitro* de citotoxidade e de liberação do fármaco.

A Tabela 9, evidencia-se os códigos das amostras utilizadas neste trabalho de pesquisa na primeira etapa e suas respectivas composições. Tabela 9 - Códigos das amostras e composições

Códigos	Composição
HJHS	HAp comercial Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
HL	HAp de laboratório Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
HLC	HAp calcinada Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
γ	Fármaco ciproflonax C ₁₇ H ₂₁ CIFN ₃ O ₄
CoF	CoFe ₂ O ₄
CoFT	CoFe ₂ O ₄ /TEOS
CoFS	CoFe ₂ O ₄ /TEOS/APTS
FeF	Fe ₃ O ₄
FeFT	Fe ₃ O ₄ /TEOS
FeFS	Fe ₃ O ₄ /TEOS/APTS

3.1 ETAPA I - Materiais e Métodos

3.1.1 Materiais

Materiais utilizados na l etapa:

- Nitrato de ferro nonohidratado Fe (NO₃)₃·9H₂O -PA 99%;
- Nitrato de cobalto II trihidratado Co (NO₃)₂. 3H₂O PA 98%.
- Glicina C₂H₅NO₂- PA 98,5%.
- Ureia CO (NH₂)₂ PA 98%;
- 3-aminopropiltrimetoxisilano [H₂N (CH₂)₃Si (OCH₃)₃] PA 97%;
- Tetra etil ortosilicato Si (OC₂H₅) -PA 99.99%;
- Cloridrato de ciprofloxacino (ciproflonax).
- Álcool etilico absoluto PA 99,5%;

• Solução amônia a 1M, PA 99,9 %

3.1.2 Síntese Química das NPM's

A obtenção das NPM's foi realizada usando a técnica de reação por combustão baseada nos conceitos da química dos propelentes e explosivos de modo a favorecer a relação estequiométrica oxidante/combustível, Φ_e = 1 (Jain *et al.*, 1981), e encontra-se detalhada no Apêndice A, para se estabelecer a estequiometria da fase de interesse. Duas rotas foram utilizadas.

Rota 1 – A síntese das NPM's de Fe₃O₄ foi feita por reação de combustão, em cadinho de sílica vítrea. Os reagentes, (31,74 g no total), correspondentes à composição desejada de (Fe₃O₄), foram misturados, formando uma mistura redutora e colocados em um reator de de microondas modelo RMW-3 da Inovetech.

Foi usada a vazão de atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo constante de 900 mL/s. O tempo de gás de arraste (purga) foi de 5 min e, o tempo de permanência do produto dentro do equipamento após a reação explosiva foi 5 min. A Figura 23a, ilustra o cadinho e a mistura dos precursores utilizados na síntese da Fe₃O₄ e na Figura 23b, um esquema detalhado do reator de microondas.



Figura 23 - Cadinho de sílica vítrea (a), esquema detalhado do reator de microondas (b).

As NPM's obtidas foram então, desaglomerados em um almofariz e peneiradas em uma peneira 325 *mesh* (44 µm) e em seguida foram encaminhadas para caracterização.

A Figura 24, apresenta de forma simplificada o fluxograma do processo de síntese das nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄.



Figura 24 - Fluxograma do processo de síntese das NPM's de Fe₃O_{4.}

Rota 2 – A síntese das NPM's de CoFe₂O₄ foi feita em um reator cônico, de acordo com a metodologia proposta por Costa e Kiminami, (2012). Para tanto, a sintese se processa em um recipiente de aço inox com capacidade volumétrica de 2L e capacidade de produção em bateladas de 10 g do produto, como ilustrado na Figura 25. A reação ocorreu sob atmosfera oxidante e o combustível utilizado para síntese foi à ureia, a reação se processou a temperatura aproximada de 600 °C.



Figura 25 - Recipiente e reator utilizado para a obtenção das NPM's de CoFe₂O₄ por reação de combustão.

Posteriormente, a obtenção do produto da reação (flocos porosos) foi desaglomerado em malha 325 (abertura ABNT 45 μm) e submetido às caracterizações. A Figura 26, ilustra o fluxograma utilizado para a síntese química das NPM's de CoFe₂O₄. Os cálculos estequiometricos para a síntese da CoFe₂O₄ se encontra detalhado no Apêndice B.



Figura 26 - Fluxograma do processo de síntese das NPM's de CoFe₂O₄.

3.1.3 Síntese da HAp por precipitação

A hidroxiapatita foi sintetizada tomando como referência a metodologia proposta por Saeri *et al.*, (2003); Rigo *et al.*, (2007); Barros *et al.*, (2012); Medvecky *et al.*, (2013) e Teixeira, (2013) mediante o método de precipitação usando a relação de fósforo/cálcio = 1,67. Inicialmente, foram preparadas soluções de hidróxido de cálcio [Ca (OH)₂] e de ácido fosfórico (H₃PO₄) a 2M. A solução de hidróxido de cálcio foi submetida à agitação constante por 30 minutos em um misturador/aquecedor IKA®RH basic KT/C até atingir a temperatura de 80 °C.

Em seguida, a esta mistura, foi adicionado gota a gota a solução de ácido fosfórico, H₃PO₄ previamente preparada, agitando, até atingir a consistência de uma pasta que propiciou um meio adequado para manter em suspensão as partículas do fosfato de cálcio. Depois de atingida a consistência desejada, a solução permaneceu em estufa FANEM Modelo 315 a temperatura de 110 °C por 24 horas. O produto resultante da secagem foi triturado em almofariz ágata, peneirado em malha ABNT 100 mesh (150 µm) e, então calcinada à 900 °C por 120 min em forno marca EDG modelo 3000. O produto final foi então, caracterizado e utilizado para preparar as formulações dos compósitos.

A temperatura de 900 °C por 120 min foi determinada com base nos estudos reportados por Camargo *et al.*, (2007), que mostraram em seu estudo que a partir desta temperatura, o fosfato de cálcio adquire estabilidade térmica e tamanho de partícula adequado para fornecer interporosidade, o que favorece a osteocondução necessária para aplicações biomédicas.

Na Figura 27, ilustra-se o fluxograma de obtenção da HAp de laboratório e da HAp calcinada.



Figura 27 - Fluxograma da obtenção da HAp de laboratório e HAp calcinada.

Outro fator relevante que deve ser considerado na calcinação da HAp reside no fato que na temperatura em que é sintetizada, permanece resíduos de ácido e outros materiais que são citotóxicos. Então, em alta temperatura de 900 °C por 120 min, por exemplo além da estabilidade térmica e porosidade adequada para aplicações biológicas temos também, a garantia que os resíduos foram todos eliminados, obtendo-se assim, uma hidroxiapatita não citotóxica (Bicalho *et al.*, 2008).

Por meio da Figura 28, apresenta-se de forma ilustrativa a hidroxiapatita comercial da JHS Biomateriais (HAP-91), utilizada na síntese dos compósitos híbridos.



Figura 28 - Hidroxiapatita comercial da JHS Biomateriais (jhs.med.br/, 2017).

3.1.4 Preparação das NPM's Híbridas

Para a obtenção das NPM's híbridas, inicialmente foi preparado uma solução magnética com 2,5 g das NPM's em estudo, diluídas em 100 mL de etanol, sob agitação ultrassônica por 30 min. O revestimento com TEOS (tetraetil orto silicato) e APTS (3-Aminopropiltrietoxisilano) foi baseada na metodologia proposta por Stöber *et al.*, (1968) e Sadighian *et al.*, (2014) com modificações como descrito a seguir.

Em um balão de três bocas, de fundo redondo de 500 mL foram adicionados 3 mL de TEOS à 6 mL do fluído magnético (corresponde a 55,70 % de TEOS) (Apêndice C). A essa mistura, (fluido magnético e TEOS) foram adicionadas 160 mL de etanol, 40 mL de água deionizada e gotejando-se gota a gota uma solução de amônia a 1M, para ajuste do pH em 11 (meio que favorece a conjugação do fármaco). A mistura permaneceu durante 12 horas em uma placa de agitação magnética da marca Fisatom modelo 713, a temperatura ambiente para incorporação do TEOS as NPM's.

Após o tempo de 12 horas, descrito na etapa anterior as NPM's foram separadas externamente por um imã para facilitar sua decantação sendo então, descartada a fase líquida. As NPM's foram em seguida, lavadas com etanol e água deionizada sendo centrifugadas simultaneamente por três vezes. O híbrido NPM's@TEOS foi seco a temperatura ambiente durante 12 horas. Após essa etapa, foram adicionados 4 mL de APTS a 4 g do híbrido NPM's@TEOS (corresponde a 50,66 % de APTS) em relação a mistura total, como descrito no

(Apêndice C), sendo agitada mecanicamente por 6 horas, a temperatura de 60 ^oC seguido de lavagem com etanol e água deionizada para se obter um pH em torno de 7,0. As NPM's foram separadas externamente para facilitar a decantação, sendo em seguida lavadas com etanol e água alternadamente por três vezes para remoção do excesso de SiO₂ que não impreguinou-se as NPM's obtendo-se assim, as NPM's híbridas (NPM's@SiO₂), revestidas com grupos -OH e -NH₂ reativos. Por meio do fluxograma apresentado na Figura 29, apresenta-se de forma esquemática a obtenção das NPM's híbridas (NPM's@SiO₂).



Figura 29 - Fluxograma da obtenção das NPM's híbridas (NPM's@SiO₂).

Posteriormente após a obtenção dos híbridos NPM's@SiO₂, estes foram caracterizadas e ultilizadas na preparação dos compósitos híbridos.

3.2.1 Materiais

Os materiais utilizados nessa etapa foram:

- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação no laboratório (HL) e calcinada a 900 °C (HLC);
- HAp comercial fornecida pela empresa JHS Biomateriais (HJHS);
- NPM's hibridas silanizadas com TEOS e APTS simultaneamente (Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂) designadas FeFS e CoFS, respectivamente.

3.2.2 Obtenção dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco)

A quantidade do fármaco ciproflonax adicionada aos compósitos híbridos foi baseada na metodologia proposta por Sadighian *et al.*, (2014) quando obtiveram um carreador de fármaco formado por NPM's de Fe₃O₄@SiO₂-Doxorrubicina para tratamento do câncer.

A incorporação do fármaco ciproflonax (γ) ao híbrido NPM's@SiO₂ e aos compósitos híbridos HAp:NPM's@SiO₂ e suas proporções mássicas serão descritas na Tabela 8, ocorreu por meio de dois métodos.

3.2.2.1 Método I - Inserção do fármaco ciproflonax (γ) e obtenção dos compósitos híbridos (carreadores) HAp:NPM's@SiO₂: γ .

Para obtenção dos compósitos híbridos, inicialmente a HAp calcinada, obtida no laborátorio e a HAp comercial foram misturadas físicamente ao híbrido NPM's@SiO₂, nas proporções mássicas e composições desejadas descritas na Tabela 10, onde se apresenta as fórmulas, códigos e massa de cada componente que foi utilizado na obtenção dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco).

Códigos	Formulações	Proporção mássica de HAp:NPM's no compósito	НАр	FeF	γ	CoF	Massa total (g)
HFeFSγ1	HAp:Fe₃O₄@SiO₂+γ	70:30	17,5	7,5	2,5	-	27,5
HFeFS γ_2	HAp:Fe₃O₄@SiO₂+γ	50:50	12,5	12,5	2,5	-	27,5
HFeFSγ ₃	HAp:Fe₃O₄@SiO₂+γ	30:70	7,5	17,5	2,5	-	27,5
HJFeFSγ1	HApJHS:Fe₃O₄@SiO₂+γ	70:30	12,6	5,4	1,8		19,8
HCoFSγ ₁	HAp:CoFe₂O₄@ SiO₂+γ	70:30	17,5	-	2,5	7,5	27,5
HCoFSγ ₂	HAp:CoFe₂O₄@ SiO₂+γ	50:50	17,5	-	2,5	7,5	27,5
HCoFSγ ₃	HAp:CoFe₂O₄@ SiO₂+γ	30:70	17,5	-	2,5	7,5	27,5
HJCoFSγ1	HAJHS:CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ +γ	70:30	12,6	-	1,8	5,4	19,8

Tabela 10 - Formulações e códigos dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco).

Para tanto, o híbrido NPM's@SiO₂, foi previamente misturado a hidroxiapatita e dissolvido em 60 mL de água deionizada, sendo em seguida, incorporado o fármaco ciproflonax (γ) (10g) para 100 g do compósito HAp:NPM's@SiO₂. A mistura foi então, submetida a agitação constante durante 30 minutos usando um agitador magnético modelo IKA®RH basic KT/C a temperatura ambiente até atingir a conscistência de uma pasta homogênea. Na Figura 30, apresenta-se o fluxograma de obtenção dos compósitos híbridos HAp:NPM's@SiO₂:γ.



Figura 30 - Fluxograma da obtenção dos compósitos híbridos HAp:NPM's@SiO2:γ

Os compósitos híbridos HAp:NPM's@SiO₂:γ obtidos, foram então, secos e posteriormente desaglomerados em almofariz de ágata e passado em

peneira ABNT malha 325 mesh (45 µm).

3.2.2.2 Método II - Inserção do fármaco ciproflonax (γ) e obtenção do compósito híbrido (carreador) HAp:NPM's@SiO₂:γ.

Após a obtenção do fluído magnético e adição do TEOS obteu-se os híbridos NPM's@TEOS como descrito no *item 3.1.4.*

Aos híbridos NPM's@TEOS (100 g) foram adicionados 100 mL de APTS e gotejado duas gotas de ácido acético glacial como catalisador. O fármaco (10 mg) foi adicionado a dispersão coloidal sendo agitada mecanicamente por 6 horas, a temperatura de 60 °C e a reação de conjugação do fármaco foi processada durante 48 horas a temperatura ambiente. Sendo em seguida lavadas com etanol e água deionizada e secas na estufa a temperatura de 60 °C durante 12 horas.

Para obtenção dos compósitos híbridos a HAp calcinada obtida no laborátorio foi misturada físicamente ao híbrido NPM's@SiO₂:γ obtidos na etapa anterior. Para tanto, o híbrido NPM's@SiO₂:γ foi previamente dissolvido em 60 mL de água deionizada e adicionado a HAp conforme proporções mássicas como descritas na Tabela 8. A mistura foi então, submetida a agitação constante durante 30 minutos usando um agitador magnético modelo IKA®RH basic KT/C a temperatura ambiente até atingir a conscistência de uma pasta homogênea. Na Figura 31, apresenta-se o fluxograma de obtenção dos compósitos híbridos.

Após essa etapa, os compósitos híbridos HAp:NPM's@SiO₂:γ, obtidos, foram levados a estufa a temperatura de 60 °C sendo secos e posteriormente desaglomerados em almofariz ágata e passado em peneira ABNT malha 325 mesh (45 μm) e submetidos as caracterizações.



Figura 31 - Fluxograma de obtenção dos compósitos híbridos HAp:NPM's@SiO₂:γ pelo método II, de inserção do fármaco.

3.2.2.3 Obtenção dos compósitos híbridos HC e HF

Os compósitos híbridos HC e HF nas proporções mássicas descritas na Tabela 11, será preparado sem o fármaco, com as NPM's e HAp para a partir deles observar-se o efeito da HAp visando o tratamento da osteomielite no que diz respeito, a osteocundução, osteoindução e osteointegração e as NPM's revestidas com a SiO₂ para acelerar o metabolismo e difundir a hidroxiapatita no local da osteomielite.

Códigos	Formulações	Proporção mássica de HAp:NPM's no compósito	НАр	FeF	CoF	Massa total (g)
HF	HAp:Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	70:30	11,2	4,8	-	16
HC	HAp: CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂	70:30	11,2	-	4,8	16

Tabela 11 - Formulações e códigos dos compósitos híbridos

Para tanto, o compósito foi obtido utilizando HAp:NPM's@SiO₂ que foi previamente dissolvida em 60 mL de água deionizada, sob agitação constante em 30 minutos, usando um agitador magnético modelo IKA®RH basic KT/C a temperatura ambiente. A Figura 32, apresenta o fluxograma de obtenção dos compósitos híbridos HC e HF.





Após secagem, os compósitos foram desaglomerados em almofariz de ágata e passado em peneira ABNT malha 325 mesh (45 μm).

3.2.2.4 Obtenção dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco) Cγ e Fγ.

Após a preparação do fluído magnético e adição do TEOS obteu-se os híbridos NPM's@TEOS como descrito no *item* 3.1.4. Aos híbridos NPM's@TEOS (100 g) foram adicionados 100 mL de APTS e gotejado duas gotas de ácido acético glacial como catalisador. O fármaco (10 mg) foi adicionado a dispersão coloidal, sendo agitado mecanicamente por 6 horas, a temperatura de 60 °C e a reação de conjugação do fármaco foi processada durante 48 horas a temperatura ambiente.

Na Tabela 12, são apresentados as formulações e códigos dos híbridos (carreadores de fármaco) sem hidroxiapatita em relação as quantidades mássicas de NPM's@SiO₂ e ao fármaco (γ) ciprofloxacino (ciproflonax) utilizadas nesta tese.

Códigos	Formulações	FeF	γ	CoF	Massa total (g)
Cγ	CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ +γ	25	2,5		27,5
Fγ	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ +γ		2,5	25	27,5

Tabela 12 - Formulações e códigos dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco).

A Figura 33, ilustra o fluxograma de obtenção dos compósitos híbridos Cy e Fy.



Figura 33 - Fluxograma da obtenção dos compósitos híbridos Cy e Fy.

A lavagem dos compósitos híbridos foi feita com etanol e água deionizada alternadamente, sendo repetida por três vezes e posteriormente secas na estufa a temperatura de 60 °C durante 12 horas, sendo posteriormente submetidos às caracterizações.

3.3 CARACTERIZAÇÕES

3.3.1 Difração de Raios X – DRX

A determinação das fases presentes, cristalinidade e o tamanho de cristalito foram determinados a partir dos dados de difração utilizando um difratômetro de raios X da BRUKER (modelo D2 Phaser, radiação Cu K). O ensaio foi realizado no Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) da UFCG.

A cristalinidade foi determinada a partir da razão entre a área integrada do pico referente à fase cristalina e a área referente à fração amorfa.

O tamanho de cristalito foi calculado a partir das linhas de alargamento de raios X principais de cada amostra por meio da deconvolução da linha de difração secundária do césio policristalino (utilizado como padrão) utilizando-se a Equação 4 de Scherrer, (1918).

$$Dhkl = \frac{k\lambda}{\beta\cos\theta} \tag{4}$$

Em que k é o coeficiente de forma do ponto da rede recíproca (0,9-1,0), λ é o comprimento de onda da radiação a ser utilizada (1,54 A- Cu k α), β é a largura a meia altura do pico (FWHM) e θ o ângulo de difração. O parâmetro β deve ser corrigido utilizando-se a Equação 5:

$$\beta = \sqrt{\beta^2 \exp \left(-\beta^2 inst\right)}$$
(5)

3.3.2 Distribuição Granulométrica (DG)

Para a análise de distribuição e tamanho de partícula foi utilizado o equipamento analisador de nanopartículas SZ-100 series (HORIBA Scientific) que mede a granulometria na faixa de 0,3 nm a 8 µm. O SZ-100 utiliza a técnica de dispersão dinâmica da luz para determinar o tamanho das partículas. Espalhamento de luz dinâmica é a medição de flutuações na intensidade de luz dispersa com o tempo. A leitura ocorreu por meio do movimento Browniano das partículas em um dispersante adequado. Para esse ensaio 0,0015 g do material foi disperso em 10 mL de solução do defloculante

sílica a 50 %. O ensaio foi realizado no no Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) da UFCG

3.3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR

Os espectros foram obtidos na região do infravermelho médio foram obtidos num espectrofotômetro por tranformada de Fourier (FTIR), modelo 660-IR da marca VARIAN, usando o método de transmissão com porta amostra da Pike e KBr como agente dispersante. Este ensaio foi realizado no Instituto de Química e Biotecnológia (IQB) da UFAL.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A morfologia e a estimativa do tamanho das partículas, bem como a presença de aglomerados, foram analisadas por microscópio MEV Philips FEG XL30 do (Laboratório de Caracterizações, LCE/DEMa, UFSCar). Os pós foram dispersos em álcool isopropílico com uso de ultrassom e depositados sobre porta-amostra de alumínio previamente polido. Todas as amostras foram recobertas com Au que atuou como meio condutivo.

3.3.5 Análise Textural

A determinação da área superficial foi realizada pelo método de adsorção de nitrogênio/hélio desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (BET). Foi utilizado um equipamento modelo NOVA 3200, marca Micromeritics. Esta técnica também foi usada para determinar o tamanho médio de aglomerados de partículas (diâmetro esférico equivalente) por meio da Equação 6 (Reed,1996):

$$D_{BET} = \frac{6}{S_{BET} \cdot \rho}$$
(6)

(onde, D_{BET} é o diâmetro médio equivalente (nm), S_{BET} é a área superficial determinada pelo método BET (m²/g), ρ é densidade teórica (g/cm³) e 6 é um fator calculado experimentalmente e adotado para partículas de formato consideradas esféricas e sem rugosidade. As densidade teóricas (ρ) se encontram disponíveis nas fichas JCPDF do pacote de dados do programa da

Shimadzu no anexo IV. O ensaio foi realizado no Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC).

O volume de poro e o diâmetro de poro foram determinados pela teoria desenvolvida por Brunauer, Joyner e Halenda (BJH).

3.3.6 Medidas Magnéticas

A caracterização magnética foi feita utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (VSM), modelo 7404 da Lake Shore, com campo magnético máximo aplicado de 13700 G à temperatura ambiente, no Laboratório de Ensaios Destrutivo e não Destrutivo do Instituto de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). As características magnéticas tais como: magnetização de saturação (Ms), magnetização remanente (Mr) e campo coercitivo (Hc) foram obtidos a partir do gráfico das histereses, observando-se o comportamento das curvas nas proximidades da origem do plano cartesiano.

3.4 Materiais e Métodos utilizados para os ensaios *In Vitro* dos híbridos e compósitos híbridos (carreadores de fármaco).

3.4.1 Materiais

A linhagem celular utilizada para os ensaios de citotoxidade foram as células de ovário de hamster chinês de linhagem CHO-K1 (ATCC CCL-61) e extratos PEAD (controle negativo – não citotóxico) e o látex (controle positivo – citotóxico) na concentração de 200 mg/mL, preparados de acordo com o POP_TEC_002 – Preparação dos Extratos realizados no Laboratório Biosintesis P&D do Brasil LTDA em São Paulo – SP de acordo com a parceria estabelecida com a Empresa JHS Laboratório Químico LTDA (JHS Biomateriais).

Os ensaios de citotoxidade dos compósitos híbridos por sua vez, foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular & Bioquímica de fungos e protozoários (LICBfp) da Universidade Federal de São Paulo no Campus de Diadema.

A linhagem celular utilizada para os ensaios de citotoxidade foram as células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC[®], CCL-61[™])

- Soro Fetal Bovino (Vitrocell[®])
- Bicarbonato de sódio (Synth®)
- Álcool polivinílico (PVA)
- Solução de antibióticos contendo 10.000 UI/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) (Vitrocell[®]).
- Solução de tripsina-EDTA (1:250) (Vitrocell[®]).
- Frasco de cultura celular (75 cm² e 150 cm², Nest[®] e TPP[®])
- Soro fisiológico 0,9% (m/v) (Baxter[®]).
- Solução do corante vermelho neutro (NR) (50 μg/mL).
- Solução de dessorção (49% (v/v) de água ultrapurificada, 50 % (v/v) de etanol (Synth[®]).
- Ácido acético glacial (Synth[®]).
- Polietileno de alta densidade (PEAD)- (CN).
- Látex natural (CP).

3.4.2 Procedimento In Vitro – Citotoxicidade

O procedimento *in vitro* de citotoxidade foi feito seguindo duas metologias em Laboratórios diferentes como descritos a seguir.

Os ensaios de citotoxicidade das NPM's de Fe₃O₄, CoFe₂O₄ dos híbridos Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ e da hidroxiapatita (HAp) sintetizada no LaBSmaC, foram realizados no Laboratório Biosintesis P&D do Brasil LTDA em São Paulo – SP de acordo com a parceria estabelecida com a Empresa JHS Laboratório Químico LTDA (JHS Biomateriais).

Para a realização do ensaio, pesou-se aproximadamente 800 mg do controle negativo e do controle positivo. As amostras dos materiais de referência foram utilizados para preparar dois extratos na concentração de 200 mg/mL, em que, os mesmos foram preparados de acordo com o POP_TEC_002 – Preparação dos Extratos.

A aplicação e preparação das substâncias em teste, ocorreu pesando-se 1,86 g dos pós, em dois tubos de 15 mL, onde as amostras em teste foram utilizadas para preparar dois extratos na concentração de 200 mg/mL, também de acordo com o POP_TEC_002 – Preparação dos Extratos.

Para a condução dos testes de citotoxicidade utilizam-se células de ovário de hamster chinês da linhagem CHO-K1 (ATCC CCL-61), as quais foram mantidas em cultura conforme o procedimento POP_TEC_003 – Manutenção da Cultura Celular, até serem utilizadas no teste.

Buscou-se avaliar a viabilidade do uso das NPM's dos híbridos Fe₃O₄@SiO₂, CoFe₂O₄@SiO₂ e da hidroxiapatita (HAp) sintetizada no LaBSmaC. Este método representa uma simulação *in vitro* da filtração e difusão dos materiais no disco. Foi utilizada uma câmara pulpar laboratorial, *"In Vitro* Pulp Device" (IVPD), fazendo o cultivo de células odontoblastóides MDPC-23.

Para quantificar o material e/ou seus componentes que se difundem através do disco, foram utilizados radioisótopos para marcar o material experimental e medir a concentração do material difundido por calorimetria, espectrofotometria ou cromatografia (Costa e Souza, 2005).

A citotoxicidade de uma amostra é determinada pela porcentagem de

células que permanecem viáveis, após a exposição da população celular a diversas concentrações do extrato da substância teste. Para calcular essa porcentagem utiliza-se um corante vital e um agente acoplador de elétrons que ao ser incorporado pela célula produz um composto de coloração específica que pode ser detectado por um espectrofotômetro. A intensidade da cor resultante da incorporação celular é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura. Uma amostra é considera citotóxica se a viabilidade celular (V.C.) resultante da exposição das células ao extrato de maior concentração for menor do que 70% (V.C. < 70%).

O teste de citotoxicidade das NPM's dos híbridos Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ e da hidroxiapatita (HAp) sintetizada no LaBSmaC será conduzido de acordo com as normas ISO 10993-5 (*Biological Evaluation of Medical Devices – part 5 - Tests for in vitro cytotoxicity*) e ISO 10993-12 – (*Biological Evaluation of Medical Devices – part 12: Sample preparation and reference materials*), em que para a condução desse teste utilizou-se células de ovário de *hamster* chinês da linhagem CHO-K1 (ATCC CCL-61). Os materiais de referência utilizados foram o PEAD (controle negativo – não citotóxico) e o látex (controle positivo – citotóxico).

De acordo com as normas ISO 10993-5 (*Biological Evaluation of Medical Devices – part 5 - Tests for in vitro cytotoxicity*) e ISO 10993-12 – (*Biological Evaluation of Medical Devices – part 12: Sample preparation and reference materials*), a citotoxicidade de uma amostra é determinada pela porcentagem de células que permanecem viáveis, após a exposição da população celular a diversas concentrações do extrato da substância teste. Para calcular essa porcentagem utiliza-se um corante vital e um agente acoplador de elétrons que ao ser incorporado pela célula produz um composto de coloração específica que pode ser detectado por um espectrofotômetro. A intensidade da cor resultante da incorporação celular é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura. Uma amostra é considera citotóxica se a viabilidade celular (V.C.) resultante da exposição das células ao extrato de maior concentração for menor do que 70% (V.C. < 70%).

O ensaio de citotoxicidade dos compósitos híbridos por sua vez, foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular & Bioquímica de fungos e

protozoários (LICBfp) da Universidade Federal de São Paulo no Campus de Diadema.

A linhagem celular utilizada para os ensaios de citotoxidade foram as células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC[®], CCL-61[™]). O cultivo celular foi realizado em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco[®]), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (Vitrocell[®]), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Synth[®]), 1% (v/v) da solução de antibióticos contendo 10.000 UI/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) (Vitrocell[®]).

A incubação celular ocorreu a 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO₂ e o meio foi substituído a cada 2 dias até as células atingirem 80% de confluência no frasco de cultura celular (75 cm² e 150 cm², Nest[®] e TPP[®]). Quando atingiram 80 % de confluência, foram descoladas das garrafas por ação da tripsina (Solução tripsina 0,05% e EDTA 0,02% em tampão fosfato pH 7,2), repicadas e plaqueadas em placas de 96 poços (P96w), com 20000 células por poço.

Foram pesadas 0,1 g de amostra (100 mg) e diluidas em 1 mL de PVA 20% acrescidas de 9 mL de meio RPMI10% sendo esta considerada a maior concentração. A seguir foram realizadas 7 diluições 1:2. Cada amostra foi agitada utilizando-se vortex antes da diluição.

Como controles foram preparados diluições seriadas do solvente utilizando (PVA à 20%) em oito concentrações diluídas da mesma forma.

As placas com as amostras foram incubadas por 24h a 37° C e 5% de CO₂. As amostras foram retiradas e as células viáveis foram avaliadas com o corante Neutral Red 50 μ g/mL (Sigma) por 3 horas. Os poços foram lavados com 100 μ L de solução salina. Uma solução DESORB foi preparada com ácido acético 1%, água purificada 49% e etanol 50%.

Os ensaios foram realizados de acordo com o *Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests* (OECD 129, 2010) em condições assépticas de acordo com as recomendações do OECD *Principles on Good Laboratory Practice* (OECD, 1998). O esquema da disposição das amostras na placa pode ser visualizado na Figura 34.

	1	2	3	4	5	0	1	8	9	10	. 11	12	
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
B	B	VC	C1	cı	C3	C4	C	C6	C7	C8	VC	B	
С	B	VC	C1	cı	C3	C4	CS	C6	C7	C8	VC	B	
D	B	VC	Cl	Cl	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	В	
E	B	VC	C1	C1	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B	1
F	B	VC	C1	cı	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B	1
G	B	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	В	G
H	B	В	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	U.



Figura 34 - Esquema da disposição das células na placa de 96 poços. B = controle da solução; VC = controle da viabilidade celular; C1-C8 = diluições da amostra em ordem crescente de concentração (mg/mL).

Em cada um dos 96 poços, foram adicionados 150 µL de DESORB. As placas foram agitadas em agitador de placas por 10 minutos e lidas em leitora de ELISA (BIOTEK, Synergy HT) a 540 nm. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação (7):

$$VC(\%) = \left(\frac{ODsample}{ODcontrol}\right) \times 100 \tag{7}$$

em que: VC é a viabilidade celular em porcentagem, OD sample é a densidade óptica do extrato, OD control é a densidade óptica do controle de células do teste (OECD 129, 2010).

A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro de placas (Biotek) no comprimento de onda de 540 nm. Os valores de IC50 foram calculados pelo programa PHOTOTOX[®] (Statistical Software Phototox® Version 2.0 for OECD Test Guideline 432).

3.4.3 Liberação de Fármaco dos híbridos e compósitos híbridos (carreadores de fármaco)

Para os ensaios de liberação de fármaco, inicialmente foi preparada uma solução isotônica de cloreto de sódio com 0,9% em massa de NaCl em 1L de água destilada. Essa concentração de NaCl usada na solução isotônica equivale a concentração da pressão osmótica do sangue que proporciona um pH de aproximadamente 6,0.

3.4.3.4 Sistema descontínuo in vitro para liberação do fármaco

Para a cinética de liberação do fármaco, ciproflonax (adsorbato) foi montado um sistema descontínuo onde, a um becker com capacidade de 1L, foi adicionado 100 mL de solução isotônica e 0,2 g dos compósito híbridos (carreadores de fármaco) em estudo, (adsorvente), preparados para os compósitos obtidos de acordo com o método I de inserção do fármaco. Sendo posteriormente, agitado mecanicamente na faixa de 300-360 rpm. Na Figura 35, pode-se visualizar a separação da fase sólida da líquida com o auxilio de um imã, sendo recolhidas alíquotas da fase líquida para as leituras das absorbâncias no tempo de 5 até 110 minutos para quantificar a massa e o tempo de liberação do fármaco.



Figura 35 - Separação da fase sólida da líquida coletada para a análise de absorbância.

De modo particular, o compósito híbrido HFeFS $\gamma_{2'}$ foi utilizado para liberação, de acordo com o método I e II de inserção conforme descrito *no item 3.2.2.* Para tanto, adicionou-se 400 mL de solução isotônica com 0,8 g do compósito híbrido designado por (HFeFS $\gamma_{2'}$), sendo posteriormente, realizadas coletas no tempo de 60 até 3000 minutos, o que equivale ao tempo de 1 até 50 horas.

A Figura 36, ilustra o sistema descontínuo composto de um becker contendo um agitador mecânico atuando numa faixa de 300-360 rpm.



Figura 36 - Sistema descontínuo de liberação do fármaco.

As leituras das absorbâncias dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco), foram realizadas em espectrofotômetro Bel Photonics 2000 UV, na região do ultra visível no comprimento de onda máximo de 275 nm. Este comprimento foi determinado após um scanner da solução do fármaco entre 210 a 300 nm. A curva de calibração foi construída e a correlação na faixa linear da lei de Lambert-Beer, Absorbância x Concentração, foi utilizada para quantificar a concentração do fármaco nos experimentos de liberação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Etapa I – Obtenção das NPM's, da HAp e dos híbridos NPM's@SiO2

4.1.1 Difração de Raios X (DRX)

Na Figura 37, encontram-se ilustrados os difratogramas de raios X das NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) e Fe₃O₄ (FeF) como sintetizadas por reação de combustão, revestidas com o TEOS (CoFT e FeFT) e com o TEOS e APTS (CoFS e FeFS).



Figura 37 - DRX (a) padrão da CoFe₂O₄ e da Fe₂O₃, e DRX das amostras CoF, CoFT e CoFS; (b) padrão da Fe₃O₄ e da Fe₂O₃, e DRX das amostras FeF, FeFT e FeFS.

Mediante os difratogramas de raios X das NPM's de CoFe₂O₄ (CoF), revestidas com o TEOS (CoFT) e com o TEOS e APTS (CoFS), Figura 37a, observa-se a formação da fase da ferrita CoFe₂O₄ e traços de Fe₂O₃ (hematita) identificados mediante as fichas cristalográficas JCPDF 22-1086 e JCPDF 33-0664, respectivamente. Pode-se observar para todos os difratogramas a presença de picos com alta intensidade e elevada largura basal para todas as reflexões, demonstrando a cristalinidade das amostras e sua característica

nanoestrutural. Isso indica a eficiência da técnica de combustão em possibilitar a obtenção desses sistemas com características das partículas em nanoescala. Verifica-se também que a presença do TEOS ou mesmo do TEOS associado ao APTS como fonte de SiO₂ usado para revestir as NPM's não interferiu na sua estrutura.

Resultado semelhante ao obtido neste trabalho, também foi observado por Nadeem *et al.*, (2014) quando estudaram o efeito da matriz de sílica amorfa nas propriedades estrutural, magnética, e dielétrica de nanocompósitos de ferrita de cobalto/sílica (CoFe₂O₄)_{1 - y}/(SiO₂)_y (em que y = 10, 30, 50, e 60%). Todos os picos das amostras apresentam estrutura do espinélio cúbico não observaram indícios de picos da matriz de SiO₂ apenas uma pequena saliência entre 2θ = 20 e 25° devido à sua natureza amorfa.

Covaliu *et al.*, (2013) também ao estudarem a obtenção de materiais nanoestruturados híbridos de CoFe₂O₄ revestidos por biopolímeros polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG) com a finalidade de aplicações biomédicas concluíram que os nanohíbridos obtidos preservaram a estrutura cristalina da ferrita. Estes resultados estão também em concordância com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Mediante a Figura 37b, para as NPM's de Fe₃O₄ sintetizadas (FeF), revestidas com o TEOS (FeFT) e com o TEOS e APTS (FeFS) observa-se a formação da fase principal referente a Fe₃O₄ (μ) identificada mediante a ficha JCPDF 88-0315 e picos de traços da segunda fase referente a hematita Fe₂O₃ (η) identificada pela ficha padrão JCPDF 33-0664 e traços da westite COD Fe_{0,932}O, de acordo com o banco de dados do difract EVA em torno 42 e 61°, as fases hematita Fe₂O₃ e Fe₃O₄ também podem ser observar nas fichas de identificação de fases em anexo. Pode-se observar para todos os difratogramas a presença de picos com alta intensidade e elevada largura basal para todas as reflexões, demonstrando a cristalinidade das amostras e sua característica nanoestrutural. Isso indica a eficiência da técnica de combustão em reator de micro-ondas e atmosfera de nitrogênio possibilitar a obtenção desses sistemas com características das partículas em nanoescala. Verifica-se também, que a presença do TEOS ou mesmo do TEOS associado

ao APTS como fonte de SiO₂ usado para revestir as NPM's não interferiu na sua estrutura.

Este resultado corrobora com os resultados observados por França *et al.*, (2014) ao prepararem o híbrido Fe₃O₄/APTES para imobilização da GOX. Os autores observaram a presença das fases magnetita (Fe₃O₄), e hematita (Fe₂O₃) e a presença do APTES não foi identificada nos espectros de DRX devido a sua característica amorfa. De modo que o processo de silanização não alterou a estrutura cristalina da amostra.

Hong *et al.*, (2009) quando prepararam e caracterizaram nanopartículas revestidas de sílica usando Fe₃O₄ como precursor de ferrofluidos observaram uma série de picos característicos para a fase do espinélio cúbico inverso da Fe₃O₄ e tamanho médio de cristalito das partículas de 10 nm. Estes mesmos picos também foram observados para a Fe₃O₄@SiO₂ indicando que a modificação com a SiO₂ tem pouco efeito sobre a intensidade dos difratogramas de DRX das NPM's de Fe₃O₄. No entanto, foi observado que a intensidade se apresentou menor para a amostra silanizada Fe₃O₄@SiO₂ resultado do efeito de blindagem do revestimento da sílica amorfa.

Majeed *et al.*, (2014) quando sintetizaram nanopartículas de Fe₃O₄ silanizadas "*core shell*" para aplicação em hipertermia observaram que os difratogramas de DRX tanto das NPM's de Fe₃O₄ não revestidas quanto das NPM's Fe₃O₄@SiO₂, preparados a 60, 80 e 100 °C apresentaram picos da estrutura cúbica correspondente a fase da magnetita (JCPDF 88-0315, a = 8,375 Å). Os ruídos observados para a amostra incorporada com a SiO₂ (Fe₃O₄@SiO₂), foram atribuídos à presença de sílica amorfa na superfície das nanopartículas.

A Tabela 13, exibe os dados estruturais de cristalinidade e tamanho de cristalito para o pico de maior intensidade (311) – primeira ordem de difração - obtidos a partir dos resultados de DRX para as NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) e de Fe₃O₄ (FeF), revestidas com o TEOS e com o TEOS e APTS.

Amostras	Cristalinidade (%)	Tamanho de Cristalito (nm)
CoF	66	31
CoFT	65	31
CoFS	64	30
FeF	74	25
FeFT	78	35
FeFS	78	36

Tabela 13 - Cristalinidade, tamanho de cristalito para pico de maior intensidade (311) para as NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) e de Fe₃O₄ (FeF), revestidas com o TEOS e com o TEOS e APTS.

Pode-se observar de acordo com os dados expostos na Tabela 13, que ao comparar os valores de cristalinidade e de tamanho de cristalito das NPM's com as NPM's hibridizadas NPM's@SiO₂ que, tanto a cristalinidade quanto o tamanho de cristalito se mantiveram praticamente inalterados, sem mudanças significativas, indicando que o revestimento não ocasionou alterações na estrutura das NPM's em estudo e que todas as amostras são formadas por nanocristais. Sendo que, as NPM's e os híridos de Fe₃O₄ apresentaram-se mais cristalinas. A obtenção de NPM's revestidas com a SiO₂ também foi observada por Wang *et al.*, (2011) quando obtiveram nanopartículas monodispersas de CoFe₂O₄/SiO₂ pelo método de precipitação e o revestimento com SiO₂ pelo método de Stöber *et al.*, (1968).

Por meio do DRX, os autores observaram a formação da estrutura de espinélio cúbico nanocristalina formada pela CoFe₂O₄ e ausência de picos de SiO₂ devido à sua estrutura ser amorfa. Maleki *et al.*, (2015) ao obterem novos híbridos, *core-shell* a base de Fe₃O₄ revestidas com sílica e funcionalizado com ureia observaram a presença de estruturas nanocristalinas em que a presença da SiO₂ não induziu mudança na estrutura da fase espinélio Fe₃O₄.

Na Figura 38, encontra-se ilustrados os difratogramas de raios X da hidroxiapatita comercial (HJHS), da hidroxiapatita sintetizada no laboratório (HL), da hidroxiapatita calcinada (HLC) e do fármaco ciproflonax (γ). Pode-se observar para as amostras de HAp (HL e HLC), Figura 38a, a presença da fase única Ca₅(PO₄)₃OH, de acordo com a ficha padrão JCPDF 09-0432. Esta ficha corresponde a fórmula química reduzida da HAp conhecida por (Ca)₁₀(PO₄)₆(OH)₂ de acordo com as fichas Padrão 72-1243 como fase principal. Devido ao grande número de polimorfosda HAp, todas as hidroxiapatitas, tanto a sintetizada no laboratório (HL), calcinada (HLC) e comercial da JHS Biomateriais (HJHS) podem ser identificadas por diversas outras fichas, sendo que, para todas a hidroxiapatita é monofásica.



Figura 38 - Difratogramas de DRX: (a) HAp's e (b) γ .

Todas as amostras de HAp apresentaram picos com alta intensidade e elevada largura basal para todas as reflexões, demonstrando alta cristalinidade e característica nanoestrutural. Comparando as amostras entre si, verifica-se que a HAp sintetizada por precipitação (HL) e a HAp calcinada no laboratório (HLC) apresentam-se na forma polimórfica hexagonal, do grupo espacial P63/m de acordo com a fórmula Ca₅(PO₄)₃(OH). A hidroxiapatita comercial por sua vez, de fórmula (Ca₁₀ (PO₄)₆(OH)₂ apresenta-se na forma polimórfica monoclínica e ocorre no grupo espacial P21/b como pode-se observar nas fichas de identificação das fases em anexo. De acordo, com Bigi, Boanini e Gazzano, (2016) a forma monoclínica é facilmente desestabilizada pela presença de quantidades muito pequenas de impurezas e por esta razão a

forma hexagonal é geralmente encontrada em apatitas biológicas. Além disso, a forma monoclínica é transformada em hexagonal a temperaturas acima de 250 °C formando HAp monofásica e com características das partículas em nanoescala.

Assim sendo, pode-se observar que a hidroxiapatita sintetizada por precipitação no laboratório, LaBSmaC, quando comparada a hidroxiapatita comercial HAP-91 da JHS biomateriais apresenta-se com características nanocristalinas, monofásicas e apresenta-se estável para aplicação como apatita biológica.

A obtenção de HAp monofásica também foi observada por Farzadi *et al.*, (2014) quando sintetizaram a HAp e estudaram suas propriedades estruturais antes e após a incorporação no magnésio. Os autores observaram picos de difração nítidos, indicando elevada cristalinidade da estrutura da fase majoritária da HAp de acordo com o padrão JCPDF 09-0432.

Alshemary *et al.*, (2014) promoveram a caracterização estrutural, óticas e estudaram a bioatividade *in vitro* de mesoporos de HAp dopada com érbio. Os autores observaram para os difratogramas de DRX a presença da fase majoritária da HAp pura e cristalina de acordo com o padrão JCPDF 09-432. A ausência de reflexão em 30,9° confirmou que a HAp sintetizada estava livre da segunda fase b-TCP (beta-tricálcio-fosfato).

Na Figura 32b, verifica-se que o difratograma de DRX do fármaco (γ), cloridrato de ciprofloxacino (ciproflonax), é formado de duas fases: a fase principal constituída por C₁₁H₁₆N₃O₂ (5-etil-6-hidroxi-2- (1-piperidil) pyrimidin-4- ona) e picos de segunda fase referente ao C₁₅H₁₂ClN₃O (N- (2-cloro fenil) -5- metil pirazol [1,5a] piridina-3-carboxamida).

A Tabela 14, ilustra os resultados da cristalinidade e do tamanho de cristalito para a reflexão de primeira ordem de (intensidade) da HAp comercial (HJHS), sintetizada (HL) e do fármaco (γ).

107

Amostras	Cristalinidade (%)	Tamanho de Cristalito (nm)
HJHS	68	54
HL	81	42
HLC	89	58
γ	88	50

Tabela 14 - Cristalinidade, tamanho de cristalito para as amostras em estudo.

Mediante a Tabela 14, observa-se que, a hidroxiapatita sintetizada no laborátorio (HL), calcinada (HLC) e a hidroxiapatita comercial da (HJHS), apresentaram característica nanométrica e cristalinidade elevada. Sendo que, a hidroxiapatita sintetizada (HL) e calcinada (HLC) apresentaram cristalinidade mais elevada quando comparada a hidroxipatita comercial da JHS Biomateriais. Na Figura 39, apresenta-se a estrutura óssea que apresenta a composição do osso em diferentes escalas de tamanho.



Figura 39 - Estrutura óssea que apresenta a composição do osso em diferentes escalas de tamanho (Cunha, 2010).
Como já mencionado anteriormente, na revisão de literatura, a hidroxiapatita apresenta-se muito similar ao tecido ósseo induzindo o crescimento desse tecido (osteocondução) e induz a proliferação de osteoblastos e outras células do osso através da ligação colágeno, proteínas e água promovendo a regeneração do tecido como pode-se observar na Figura 39. Assim sendo, quanto mais nanocristalina for a hidroxiapatita melhor a ligação com essas células e melhores serão as respostas de proliferação celular e osteoblasticas, essa característica foi observada de acordo com as propriedades nanoestruturais de forma mais promissora para a hidroxiapatita sintetizada (HL) e calcinada (HLC), ambas sintetizadas no LaBSmaC na UFCG.

O fármaco ciproflonax por sua vez, também apresentou tamanho nanométrico valores elevados de cristalinidade. Resultado semelhante também foi observado por Liu *et al.*, (2005) quando avaliaram a cristalinidade do cloridrato de ciprofloxacino monohidratado e observaram a existência de uma nonoestrutura de elevada cristalinidade.

4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 40, encontram-se ilustrados, os espectros vibracionais na região do infravermelho, na faixa de 4000 – 500 cm⁻¹, das NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) e Fe₃O₄ (FeF) como sintetizadas por reação de combustão, revestidas com o TEOS (CoFT e FeFT) e com o TEOS e APTS (CoFS e FeFS). De acordo com a Figura 44a, verifica-se para as NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) duas bandas fracas de absorção atribuídas ao estiramento do grupo O-H, devido à água livre e/ou absorvida por volta de 1630 e 3660 cm⁻¹.

As bandas de O-H em torno de 1630 cm⁻¹ referente as amostras (CoFT e CoFS) também foram atribuídas ao grupo Si-OH, pois o grupo O-H livre se liga ao silício do TEOS e APTS. Outra banda fraca de absorção pode ser observada por volta de 1370 cm⁻¹ atribuída à vibração da ligação N-O decorrente do nitrato usado para obtenção das NPM's, grupo este presente no produto da reação de combustão.



Figura 40 - FTIR: (a) amostras CoF, CoFT e CoFS e (b) amostras FeF, FeFT e FeFS.

Na faixa de 1000-500 cm⁻¹, as bandas no infravermelho dos sólidos são geralmente caracterizadas por vibrações de íons na rede do cristal. As principais bandas, neste intervalo estão por volta de 566 e 440 cm⁻¹ correspondente aos estiramentos Fe-O e Co-O (v_1 e v_2) dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura cristalina do espinélio inverso. Pode-se observar mediante os espectros, a presença destas duas bandas características da estrutura do espinélio para as NPM's sintetizadas e revestidas com o TEOS e APTS.

A presença das bandas v_1 e v_2 características dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura cristalina do espinélio, obtidas neste trabalho corroboram com os resultados obtidos por Pon-On *et al.*, (2011) quando promoveram a encapsulação de CoFe₂O₄ magnética em nanocompósitos de SiO₂ usando hidroxiapatita como moldes para carreador de fármaco. Os autores observaram uma ampla banda em 3416 cm⁻¹, devido à água absorvida sobre a superfície e bandas em 798 e 885 cm⁻¹ causada pelas vibrações (alongamento) das coordenações tetraédricas e octaédricas dos íons CO⁺² e Fe⁺³.

Khandekar *et al.*, (2011), quando estudaram as propriedades estruturais e elétricas das NPM's de cobalto sintetizada por reação de combustão e o efeito da temperatura de calcinação sobre as amostras sintetizadas. Os autores observaram estas duas bandas por volta de 740-780 cm⁻¹ e 460-490 cm⁻¹.

Para as amostras revestidas com TEOS e APTS (FeFT e FeFS) podese observar que além das bandas visualizadas para as NPM's como sintetizadas (FeF), observou-se a presença de grupos reativos capazes de promover a conjugação entre as NPM's ao fármaco e a biomoléculas.

A amostra designada por (CoFT), revestida com o TEOS por sua vez, apresenta duas bandas de estiramentos Fe-O e Co-O (v_1 e v_2) dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura cristalina do espinélio inverso, uma banda de absorção larga em torno 3770-1781 cm⁻¹ é atribuída à sobreposição nos estiramentos dos grupos funcionais O-H e/ou Si-OH e bandas em 2352 cm⁻¹ e 1553 cm⁻¹ correspondentes aos grupos CO e NO respectivamente. Observou-se também, a presença de bandas em torno de 1109 cm⁻¹ que corresponde ao estiramento assimétrico do grupo -O-Si-O- e em 1350 cm⁻¹, 707 cm⁻¹, e 794 cm⁻¹ proveniente de grupos silanóis resultantes do revestimento com o TEOS, precursor da sílica SiO₂.

No que se refere, a ferrita de cobalto silanizada com TEOS e APTS designada por CoFS simultaneamente observa-se que as bandas de absorção larga se encontram em torno 3808-1692 cm⁻¹ atribuído à sobreposição nos estiramentos dos grupos funcionais O-H e/ou Si-OH e bandas em 2339 cm⁻¹ e 1477 cm⁻¹ correspondentes aos grupos CO e NO respectivamente. Observou-se também, a presença de bandas em torno de 1060 cm⁻¹ que correspondem ao estiramento assimétrico do grupo -O-Si-O- e em 1300 cm⁻¹, 455 cm⁻¹, e 942 cm⁻¹ proveniente de grupos silanóis resultantes do revestimento com o TEOS e APTS, precursores da sílica SiO₂. As bandas no intervalo de 566 e 477 cm⁻¹ correspondente aos estiramentos Fe-O e Co-O (v_1 e v_2) dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura cristalina do espinélio inverso. Este mesmo comportamento também foi observado nos trabalhos reportados por diversos autores.

Pon-On et al., (2011) quando promoveram a encapsulação de CoFe₂O₄

magnética em nanocompósitos de SiO₂ usando HAp para carreador de fármaco; Kooti e Afshari (2012) ao prepararem um catalisador constituído por ácido fosfotúngstico suportado em nanopartículas de cobalto revestidos por sílica e por Tang *et al.*, (2012), quando estudaram o compósito Co_{0,8}Ni_{0,2}Fe₂O₄/PVP usando o agente de acoplamento silano metacrilato de 3-trimetoxissilil. Estes autores observaram bandas características do agente silano indicando que os grupos reativos foram introduzidos na superfície das nanopartículas, ou seja, as nanopartículas silanizadas foram formadas por uma reação entre o silano e os grupos hidroxilas da superfície das nanopartículas.

Na Figura 44b, pode-se notar por meio dos espectros de FTIR para as NPM's de Fe₃O₄ conforme sintetizada (FeF) uma banda larga em torno de 3290 cm⁻¹ corresponde às vibrações dos grupos (O-H), hidroxilas livres ou ligados ao hidrogênio, resultante da água fisicamente adsorvida. As bandas em torno de 1343 cm⁻¹, 2969 cm⁻¹, 1366 cm⁻¹ estão relacionadas com às vibrações de estiramento do grupo CH₂. A banda em torno de 1375 cm⁻¹ corresponde ao grupo CH₃. A banda em 1098 cm⁻¹ corresponde ao grupo NO₂, em 1121 cm⁻¹ observa-se uma banda referente ao grupo Si-O-Si proveniente nas impurezas dos reagentes precursores da Fe₃O₄. A banda de absorção em torno de 1390 cm⁻¹, observada é característica dos grupos O-H. A presença da magnetita é observada pela forte banda em 804 e 923 cm⁻¹, característica da vibração Fe-O.

Para as NPM's de Fe₃O₄ revestidas com o TEOS, amostras FeFT verifica-se a presença de bandas referentes ao grupo OH, possivelmente estas bandas foram sobrepostas pelas bandas da SiO₂ e formando os grupos Si-OH. Pode-se visualizar também, uma pequena banda em torno de 2957 cm⁻¹ referente ao grupo CH₂. Em 1056 cm⁻¹ pode-se observar uma banda referente ao estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si e em 960 cm⁻¹ e em 816 cm⁻¹ observa-se as bandas características da vibração Fe-O que confirmam a presença da Fe₃O₄, conforme observado no DRX da Figura 37b.

No que diz respeito, as NPM's de Fe₃O₄ revestidas com o TEOS e APTS, amostra designada por FeFS observa-se a presença da banda de NO em 2933 cm⁻¹, e em 1450 cm⁻¹ observa-se a banda referente ao alongamento simétrico da ligação Si-OH e em 1043 cm⁻¹ a banda é referente à vibração

assimétrica da ligação Si-O-Si. As bandas características da vibração Fe-O podem ser observadas em 804 cm⁻¹ e 923 cm⁻¹. Essas bandas são indicativas da existência de SiO₂ nas NPM's de Fe₃O₄.

Estas bandas estão em concordância com as bandas reportadas nos trabalhos de Sundar *et al.*, (2014) quando promoveram a síntese e caracterização de nanopartículas magnetita modificada para aplicação como carreadores de fármaco anticâncer; Pingarrón *et al.*, (2012) quando estudaram a obtenção de nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com o agente silano APTS para aplicação em biossensores, e por Kumar *et al.*, (2013) quando estudaram a obtenção de nanopartículas magnéticas magnéticas de magnéticas de magnetita funcionalizadas com o agente silano APTS para aplicação de nanopartículas magnéticas magnéticas de magnéticas de magnetita funcionalizadas com agentes os silanos APTS e TEOS para aplicação em nanobiocatalisadores.

A partir da Figura 41, ilustra-se o espectro vibracional na região do infravermelho na faixa de 4000–500 cm⁻¹ para a hidroxiapatita comercial (HJHS), a hidroxiapatita sintetizada no laboratório (HL) e calcinada (HLC).



Figura 41 - FTIR das amostras de HAp comercial (HJHS), HAp sintetizada no laboratório (HL) e HAp calcinada.

A Tabela 15, apresenta os valores das bandas de absorção e do número de onda observados no espectro da Figura 41, para a hidroxiapatita sintetizada (HL), a hidroxiapatita comercial (HJHS) e a calcinada (HLC).

HL		H	JHS	HLC	
Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de absorção	Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de absorção	Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de absorção
1031; 1011	PO43-	1019; 1079	PO₄³-	1014, 916	PO43-
877	CO ₃ -2 proveniente do ar	972 e em 1629	CO ₃ -2	1369; 770	CO ₃ -2
3580-2957	Estiramento de OH	3555 e 2933	Estiramento de OH	3600; 3550	Estiramento de OH

Tabela 15 - Número de onda e banda de absorção para a hidroxiapatita sintetizada (HL), para a hidroxiapatita comercial (HJHS) e hidroxiapatita calcinada (HLC).

Mediante a Figura 41 e Tabela 15, observa-se as bandas vibracionais e o número de onda típicas da hidroxiapatita HAp sintetizada e calcinada pelos grupamentos PO_4^{3-} em torno de 1031 cm⁻¹. O grupo CO_3^{-2} observado em 877, 972 e 770 cm⁻¹ é proveniente do ar, visto que, as amostras foram produzidas em atmosfera aberta e em solução aquosa. Para a hidroxiapatita HAp comercial foram observadas bandas de absorção em 1014 e 916 cm⁻¹ de grupos PO_4^{3-} . As bandas em torno de 1369 e 770 cm⁻¹ estão relacionadas a grupos CO_3^{-2} e em 3600 e 3550 cm^{-1,} devido ao estiramento de grupos OH.

Outra constatação, foi a presença da frequência de estiramento OH em torno de 3580-2957 cm⁻¹ e 3600 e 3550 cm⁻¹ para a HAp sintetizada (HL) e calcinada (HLC). Pode-se observar ainda, a presença do grupo CO₃⁻² em torno de 1458 cm⁻¹ para a HAp sintetizada (HL). Indicando assim, a presença da fase HAp na composição, caso já constatado no difratograma de raios X.

Estes resultados também foram observados por Bicalho *et al.*, (2008) ao estudarem a HAP-91 e colágeno- HAp (COL-HAP 91 casuísticas) e observaram bandas referente a água em: 3700-3000 cm⁻¹ e 1615 cm⁻¹, bandas de HPO4⁻², em 865 cm⁻¹ e 550 cm⁻¹, bandas de OH⁻ em 630 cm⁻¹ e bandas de PO4⁻³ em 600 e 471 cm⁻¹.

Gheisari *et al.*, (2015) quando obtiveram um nanocompósito cerâmico formado por HAp -Hardystonite (Ca₂ZnSi₂O₇) observaram bandas de absorção a 560 cm⁻¹ e 600 cm⁻¹ e em 1000 cm⁻¹, 1100 cm⁻¹ devido a água adsorvida e bandas relativamente amplas, a partir de 3600-2600 cm⁻¹ com um pico em 3570 cm⁻¹ relativo aos agrupamentos PO₄³⁻ a banda mais fraca foi observada em 630 cm⁻¹ relativos ao CO₃⁻². Prodana *et al.*, (2015) quando obtiveram um novo revestimento cerâmico complexo com nanotubos de carbono, HAp e TiO₂ para aplicações biomédicas observaram o alongamento e flexão e modos de vibração de OH⁻ identificados em 3270 cm⁻¹ e 634,23 cm⁻¹, respectivamente. Modos de alongamento e flexão foram observados em 560 cm⁻¹, 3960 cm⁻¹, 1099,33 cm⁻¹, 1042 cm⁻¹ referentes ao grupo PO₄⁻³ e confirmaram a formação de uma apatita bem cristalizada. A banda de carbonato foi observada em 1640 cm⁻¹ e o pico observado a 2354 cm⁻¹ foi atribuído a dióxido de carbono adsorvido.

De acordo com os trabalhos dos autores reportados verifica-se que as bandas observadas nas HAp estudadas neste trabalho estão em concordância com a literatura.

Na Figura 42a, ilustra-se o FTIR do fármaco (γ) cloridrato de ciprofloxacino (ciproflonax) na faixa de 4000 – 500 cm⁻¹. As bandas de adsorção, e os comprimentos de onda encontram-se reportados na Tabela 16.

As bandas de absorção relatadas são características do fármaco (γ) ciproflanax constituídos de óxidos em sua composição e estão em concordância com as bandas reportadas por Lopes e Fascio (2004) quando interpretaram os espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. Tivet *et al.*, (2013) avaliando compostos orgânicos por fluorescência e espectroscopia FTIR; Bekiaris *et al.*, (2015) quando estudaram a caracterização da composição química de produtos residuais orgânicos; e Fan *et al.*, (2015), quando estudaram o efeito da matriz mineral de matéria orgânica.





Figura 42 - (a) Espectro de FTIR para o fármaco (γ) cloridrato de ciprofloxacino na faixa de 4000 – 500 cm⁻¹ e (b) ampliação do espectro na faixa de 1500-650 cm⁻¹.

A partir do espectro de FTIR, reportado na Figura 42 e da Tabela 16 referente ao fármaco, observa-se inúmeras bandas reativas capazes de se ligar a biomoléculas, que possam ser utilizadas no tratamento da osteomielite. A presença dessas também foram reportadas por Silva-Júnior *et al.*, (2008) quando fizeram a análise térmica de micropartículas biodegradáveis contendo cloridrato de ciprofloxacino obtido pela técnica de secagem por pulverização. Os autores observaram que todas essas bandas são típicas do fármaco ciproflonax.

Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de absorção	Atribuições
3315-3374-3211 e 3088	OH; NH	Alongamento simétrica; alongamento
3023	CH; OH	Alongamento
2913	C-H de CH₃; OH	Estiramento assimétrico; alongamento
2841-2763-2686-2621	CH- CH ₂ -N; C=O; OH	Estiramento simétrico; alongamento; alongamento; alongamento de OH
2504	COOH; OH	Alongamento
1419-1398-1398-1385- 1341	C-X (X=F, CI)	Alongamento
1307	CH₃; C-F	Alongamento; flexão
1273	CH _{3;} C-F	Alongamento; flexão
1221	COOH; C-F	Alongamento
1192	C-N; C-F	Alongamento
1181	C-N; C-F	Alongamento
1025-1156	Trifluormetil	Alongamento
986-962-944	C-X (X=F, CI)	Alongamento
923-906-890	RCH=CH ₂	Alongamento
850	C=CH ₂	Alongamento
835	Benzeno meta- dissubstituido	
827	Benzeno para- dissubstituido	
804	Benzeno para- dissubstituido	
786	Benzeno para- dissubstituido	
774	Benzeno para- dissubstituido	_
749	Benzeno meta- dissubstituido	_
717	Benzeno orto- dissubstituido	_
702	Benzeno monossubstituido	
670	Alcenos cis- dissubstituidos	Alongamento

Tabela 16 - Número de onda e bandas de absorção referente ao fármaco (γ) ciproflonax.

4.1.3 Análise Textural por Adsorção de Nitrogênio (BET)

Na Tabela 17, encontram-se os valores de área superficial específica (S_{BET}) , tamanho de partícula (D_{BET}) , volume do poro (V_p) , diâmetro do poro (Dp) e a relação entre o tamanho de partícula e o tamanho de cristalito (Tc), referente as amostras em estudo. O cálculo dos valores de volume de poro (V_P)

Amostras	S _{вет} (m²g ⁻¹)	D _{BET} * (nm)	V _P (cm³/g)	D _P (Å)	Tc* (nm)	D _{BET} /T _C *
CoF	36,42	31,24	1,00	31,03	31	1,01
CoFT	22,12	61,01	0,77	3,75	31	1,97
CoFS	19,93	52,15	0,53	5,62	30	1,74
FeF	4,49	255,21	0,05	3,74	25	10,21
FeFT	22,12	60,63	0,13	3,11	35	1,73
FeFS	6,88	241,87	0,23	2,95	36	6,72
HJHS	23,67	80,34	0,44	7,64	54	1,49
HL	53,51	35,54	1,57	3,86	42	0,85
HLC	66,61	28,54	0,88	2,94	58	0,49
γ	1,080	n.d.	1,15	68,96	50	n.d.

e diâmetro de poro (D_P) das amostras se encontram no Apêndice D e E.

Tabela 17 - Valores de área superficial específica (S_{BET}), tamanho de partícula (D_{BET}), volume de poro (Vp) e diâmetro de poro (Dp) das amostras em estudo.

n.d. – não determinado *T_c = Tamanho de cristalito

Com relação as NPM's, verifica-se que as NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) apresentam valores de área superficial aproximadamente 9 vezes superior que as NPM's de Fe₃O₄ (FeF), em torno de 87,67 %. Pelos resultados verifica-se que as NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) são de característica nanométrica e que o tamanho de partícula é praticamente semelhante ao tamanho de cristalito, avaliado pela relação D_{BET}/D_{Tc} próximo a unidade. As NPM's de Fe₃O₄ (FeF, FeFS) apresentam o D_{BET} é superior a 100 nm e a relação de D_{BET}/D_{Tc} muito alta, o que nos indica que as partículas estão aglomeradas e são policristalinas ou seja, cada partícula é formada por um conjunto de cristais. O revestimento das NPM's de Fe₃O₄ contudo, ocasionou um aumento no tamanho de poro e na área superficial e pode ter sido ocasionada devido as ligações covalentes entre os grupos OH da superfície das NPM's com os grupos (-Si-) do APTS, aumentando a interação entre os policristais, preenchendo os poros dos aglomerados esponjosos e favorecendo a ainda mais a aglomeração, que reduziu a D_{BET}, aumentando o volume de poro e a área superficial

O revestimento das NPM's de CoFe₂O₄ com o TEOS e com o APTS por outro lado, reduziu a área superficial e o volume de poro devido ao efeito destes materiais atuaram como agentes de acoplamento por meio da ligação covalente entre os grupos OH da superfície das NPM's com os grupos (-Si-). Isto promoveu a redução da energia de superfície das NPM's e ao mesmo tempo impediu o contato direto interpartícula minimizando a aglomeração.

Comparando-se os valores de área superficial das HAp's em estudo verifica-se que a HAp comercial calcinada a 900 °C (HJHS) apresentou um valor de área superficial aproximadamente 64,46 % inferior a hidroxiapatita sintetizada e calcinada no laboratório (HLC) e 19,66 % inferior a hidroxiapatita sintetizada sem calcinação (HL). Isto era esperado visto que o tratamento térmico induz ao crescimento dos cristais. Então, a hidroxiapatita de laboratório HL produzida no laboratório tem uma característica mais nanométrica que a hidroxiapatita sintetizada no laboratório e calcinada nas mesmas condições que a HAp comercial da JHS. Para o fármaco esse parâmetro não foi possível ser determinado visto que, para a análise é necessário um tratamento térmico a 300 °C/1h e esse tratamento causa a decomposição do fármaco.

Quanto a classificação do tamanho dos poros, estudos da literatura reportam que os poros são classificados de acordo com os seguintes tamanhos: microporos quando o diâmetro for menor que 2 nm, mesoporos quando o diâmetro estiver classificado entre 2 e 50 nm e macroporos quando o diâmetro for maior que 50 nm (Teixeira *et al.*, 2001). Logo, as amostras em estudo apresentaram característica de um material com mesoporosidade, isto é, o diâmetro das amostras se localizou no intervalo entre 2 a 50 nm. A excessão para esta foi o fármaco (γ) que é considerado um material macroporoso por apresentar diâmetro de poro de 68,96 nm.

4.1.4 Distribuição Granulométrica

Na Figura 43, apresenta-se os valores de distribuição dos diâmetros esféricos das partículas equivalente em função do volume cumulativo das amostras. A distribuição granulométrica de todas as amostras se encontra-se na faixa de 10 a 10000 nm.

Com relação às NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) observa-se uma distribuição larga, assimétrica, monomodal com tamanho mediano de partícula (D50%) = 57 nm. Após o revestimento com o TEOS, amostra CoFT, observa-se um aumento no tamanho de partícula, porém, com distribuição mais estreita e tamanho mediano (D50%) = 173 nm, resultando em um aumento em torno de 67 %. Esse valor determinado foi muito elevado, o que possivelmente pode ter sido por consequência da falta de dispersão da amostra durante a análise.

Após a adição TEOS e APTS, amostra CoFS, observa-se que, o tamanho de partícula (D50%) passa a ser de 55 % comparando a amostra CoFS com a amostra CoF, ocasionando uma pequena diminuição no tamanho de partícula de 3,5 %, determinado pela análise textural, visto que o revestimento com TEOS e APTS tende a reduzir a tensão superficial (área superficial) pela formação de ligações covalentes entre as NPM's e o agente silano, que reveste as NPM's. Isso favorece a um aumento no tamanho de partícula.



Figura 43 - Distribuição granulométrica das amostras: (a) CoF, (b) CoFT e (c) CoFS

Na Figura 37, se encontra os valores de distribuição dos diâmetros esféricos das partículas equivalente em função do volume cumulativo das amostras FeF, FeFT e FeFS. Observa-se, de modo geral que, as amostras apresentaram uma distribuição de partícula estreita, monomodal e simétrica,

com tamanho mediano de partícula (D50%) = 180; 164 e 164 nm para as amostras Fe, FeT e FeS, respectivamente, ou seja, uma pequena redução em torno de 8,89 % quando comparamos a amostra sem revestimento com as amostras após revestimento com TEOS ou com TEOS e APTS simultaneamente. Esse resultado nos mostra que as partículas de magnetita são muito aglomeradas com forte ligação interpartícula o que dificulta a dispersão das amostras. Porém, a adição de TEOS e APTS tende a reduzir a tensão superfial e interconectando os poros o que favorece a diminuição interpartícula. Comparando com o tamanho de partícula determinado na análise textural verificamos que os resultados estão em concordância.



Figura 44 - Distribuição granulométrica das amostras: (a) FeF, (b) FeFT e (c) FeFS

A Figura 45, ilustra os valores de distribuição dos diâmetros esféricos das partículas equivalente em função do volume cumulativo da hidroxiapatita sintetizada no laboratório (HL), da HAp hidroxiapatita sintetizada no laboratório e calcinada (HLC) da hidroxiapatita comercial (HJHS), e do fármaco ciproflonax (γ).



Figura 45 - Distribuição granulométrica das amostras: (a) HJHS, (b) HL, (c) HLC, (d) γ

Comparando-se os valores de distribuição granulométrica das HAp's em estudo, observa-se que as curvas referentes a HAp comercial da (HJHS) e HAp sintetizada no laboratório sem calcinar (HL), Figuras 45a e 45b, apresentam o mesmo comportamento, ou seja, uma distribuição de partícula larga, monomodal e assimétrica. O tamanho mediano de partícula (D50%) da hidroxiapatita sintetizada no laboratório HL é de 43 nm, sendo o tamanho mediano de partícula 15,68 % inferior quando comparamos a hidroxiapatita comercial da JHS biomateriais designada por HJHS. A hidroxiapatita sintetizada e calcinada no laborátorio (HLC) por sua vez, apresentou o maior tamanho de diâmetro de partícula, 198 nm. Sendo 74,24 % superior ao tamanho mediano de partícula da hidroxiapatita comercial (HJHS) e 78,28 % superior ao tamanho mediano de partícula da hidroxiapatita sintetizada no laboratório (HL). De forma geral, observa-se que a calcinação ocasiona um aumento do tamanho de partícula resultados estão em concordância com os resultados tamanho de cristalito e de análise textural, respectivamente.

Entretanto, para o fármaco ciproflonax (Figura 45d) observa-se uma distribuição de partícula estreita, monomodal, simétrica e nanométrica com tamanho mediano de partícula (D50%) = 39 nm e (D10%) 23 nm, respectivamente.

A Tabela 18, expressa o tamanho dos diâmetros das partículas das amostras em estudo, de acordo com os índices de distribuição de tamanho de partícula D10, D50 e D90%, obtidos a partir das Figuras 43-45. Os parâmetros D10 e D90 estão relacionados aos diâmetros de corte da curva de distribuição acumulada em 10% e 90%, respectivamente, enquanto que, o parâmetro D50% está relacionado ao tamanho médiano de partícula (Dm).

Amostras	D (10 %) nm	D (50 %) nm	D (90 %) nm
CoF	31	57	119
CoFT	142	173	241
CoFS	25,32	55	91
FeF	116	180	226
FeFT	125	164	234
FeFS	125	164	234
HJHS	20	51	120
HL	25	43	79
HLC	146	198	332
γ	23	39	62

Tabela 18 - Diâmetros das partículas das amostras de acordo com os índices de distribuição.

Por meio da Tabela 18, pode-se observar que o maior valor de D(50%) corresponde a hidroxiapatita calcinada e o menor valor de D(50%) corresponde ao fármaco. Observa-se ainda, de forma geral, que os valores de D(50%) para as amostras que apresentam como NPM's de Fe₃O₄, apresentam maiores diâmetros de partícula visto que, o método de síntese usa a glicina que gera a obtenção de pós aglomerados esponjosos como será reportado a seguir através das micrografias da Figura 47.

4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As Figuras 46 e 47, ilustram as morfologias referentes as NPM's de

CoFe₂O₄ (CoF) e Fe₃O₄ (FeF) como sintetizadas por reação de combustão, revestidas com o TEOS (CoFT e FeFT) e com o TEOS e APTS (CoFS e FeFS). Para as amostras de ferrita CoFe₂O₄ sem e após revestimento expostas nas Figuras 46a-46c, pode-se observar, de modo geral, a formação de aglomerados na forma de novelos de tamanho irregular e inferior a 10 μ m.

Esses aglomerados são constituídos por partículas pequenas que estão interconectadas por interações fracas (partículas pré sinterizadas, ou seja, formação de pescoço interpartícula). Esse tipo de morfologia é característico de amostras de ferritas preparadas por reação de combustão usando a ureia como combustível. Para tanto, o revestimento com TEOS e/ou com TEOS seguido do APTS ocasiona uma pequena redução na porosidade tanto interaglomerados como interpartícula, Figura 46c.



Figura 46 - MEV das amostras: (a) CoF, (b) CoFT e (c) CoFS.

1um

Este resultado corrobora com os resultados obtidos por Diniz *et al.*, (2015) quando avaliaram a microestrutura e propriedades magnéticas da Fe₃O₄ sintetizada pelo método de reação de reação de combustão e observaram a

formação de aglomerados de forma irregular e tamanho que variara em torno de 20 µm, porosos e de aspecto frágeis. A porosidade observada é proveniente dos gases liberados na combustão.

Para as amostras da magnetita, Fe₃O₄ sem e após revestimento, dispostos nas Figuras 47a-47c, também não se observa mudanças perceptíveis na morfologia após o revestimento com TEOS e/ou com TEOS e o APTS como pode-se comparar a Figura 47a. Observa-se de modo geral a formação de aglomerados esponjosos de formato irregular e tamanho maiores que 10 μm.





Figura 47 - MEV das amostras: (a) FeF, (b) FeFT e (c) FeFS.

Esse comportamento é típico de materiais formados com glicina que durante o processo de síntese de combustão ocorre maior liberação dos gases, uma vez que, a natureza da aglomeração é regida por entalpia e temperatura da chama gerada durante a combustão, que por sua vez é dependente da natureza do combustível e da relação agente oxidante/agente redutor. Estes resultados obtidos estão em concordância com os trabalhos reportados por Santos, (2015), quando avaliou os combustíveis ureia e glicina na síntese por

reação de combustão de ferrita Mn_{0,65}Zn_{0,35}Fe₂O₄ correlacionando o balanço de oxigênio usando glicina como combustível e percebeu que a quantidade de gases emitidos durante a reação produz um aumento na porosidade e no tamanho dos aglomerados.

Porém, comparando as amostras após revestimento Figura 47b e 47c com a amostra sem revestimento, Figura 47a verifica-se levemente que, após o revestimento ocorreu uma redução na porosidade gerada pelo gás de combustão durante a síntese. Isso possivelmente ocorreu devido a presença do TEOS e do agente silano APTS quando acoplado aos aglomerados reduziu a porosidade tanto interaglomerados como interpartícula e consequentemente tornando as interações intermoleculares mais fortes, o que se observa nitidamente pelo contato interpartícula que se apresentam com aspecto impregnado.

Comportamento semelhante em relação a morfologia das amostras FeFT e FeFS relatadas nesse trabalho também foram observadas por França *et al.*, (2014) ao prepararem híbridos de Fe₃O₄/APTES para Imobilização da GOX. Os autores observaram pelas micrografias aglomerados na forma de blocos irregulares com tamanhos diferentes, inferiores e superiores a 10 µm, de aspecto não poroso indicando que o agente silano APTES quando acoplado aos aglomerados aumentou a rigidez das NPM's de Fe₃O₄ pelo "bloqueio" dos poros. Os aglomerados apresentaram um aspecto de blocos impregnados com material amorfo em que não foi possível observar o contato entre as partículas.

As Figuras 48 ilustram a morfologia referente a hidroxiapatita comercial (HJHS), hidroxiapatita sintetizada (HL) a calcinada (HLC) e o fármaco (γ). Para a amostra HJHS, Figura 48a e a comercial 48c observa-se uma morfologia formada por aglomerados na forma de placas constituídos por pequenas partículas interconectadas por forças fortes (sem porosidade interpartícula).

Essa morfologia é típica de amostra de HAp calcinada a 900 °C e essa mesma característica já foi reportada por Bicalho *et al.*, (2008) quando estudaram a HAp-91 (HAp comercial da empresa JHS Biomateriais) calcinada a 900 °C e observavam a presença de cristais prismáticos longos, curtos ou tabulares no formato hexagonal e na forma de agulhas.

Para a hidroxiapatita sintetizada (HL), Figura 48b pode-se visualizar

uma morfologia mais fina formada por aglomerados na forma de novelos (esférica) de tamanho menores que 10 µm constituídos por partículas bem pequenas (nanométricas) ligadas por forças fracas e com porosidade interpartícula.



Figura 48 - MEV das amostras: (a) HJHS, (b) HL e (c) HLC (d) γ .

Essa morfologia é típica de amostras de HAp sem sofrer calcinação, a morfologia de HAp esférica e nanoestruturada favorece a proliferação celular e a ligação com o tecido ósseo, como discutido anteriormente para os difratogramas de DRX e ilustrados na Figura 39. Morfologia semelhante a esta foi observada por Benício *et al.*, (2012) quando analisaram a incorporação do MTA na hidroxiapatita para aplicação ortodôntica e obtiveram morfologias de HAp na forma de aglomerados formado por pequenas partículas com baixa porosidade interpartículas de formato esférico, distribuição estreita em torno de 10 µm de tamanho.

Na Figura 48d, foi evidenciada a micrografia referente ao fármaco, onde se observa a distribuição de aglomerados largos (grandes e pequenos), nos quais estes se encontram na forma de novelos constituídos de partículas pequenas e interligadas. Estes aglomerados apresentam baixa porosidade interpartícula e observa-se a formação de poucos poros distribuídos em toda a amostra.

4.1.6 Medidas Magnéticas

A Figura 49, ilustra o comportamento da magnetização (*M*) em função do campo magnético aplicado (*H*) por meio do laço de histerese para as NPM's de CoFe₃O₄ (CoF) e Fe₃O₄ (FeF) e após revestimento com o TEOS (CoFT e FeFT) e com TEOS e APTS simultaneamente (CoFS e FeFS), a hidroxiapatita comercial (HJHS), hidroxiapatita sintetizada (HL), hidroxiapatita sintetizada e calcinada no laboratório (HLC) e o fármaco (γ).



Figura 49 - Curvas de histerese para: (a) CoF, CoFT, CoFS (b) FeF, FeFT e FeFS, (c) HJHS, HL, HLC e γ (d).

Para as NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) e Fe₃O₄ (FeF) sem e com revestimento com TEOS e com TEOS e APTS simultaneamente podemos observar um comportamento típico de materiais ferrimagnéticos, com formação de um laço (curva) de histerese bem definido, onde as amostras apresentam uma magnetização de saturação (Ms), uma magnetização remanente (Mr) e

um campo coercitivo (Hc) (campo necessário para desmagnetizar o material). A diferença entre essas duas NPM's está no tipo de material magnético. A magnetita (Fe₃O₄) é um material magnético mole "soft" que magnetiza e desmagnetiza com baixos valores de campo aplicado, em torno de 258 Oe, Figura 49b, enquanto que a ferrita de CoFe₂O₄ é um material magnético duro "hard" que magnetiza e desmagnetiza com valores de campo aplicado elevado, em torno de 1190 Oe.

Esse comportamento, ferrimagnético é típico de materiais magnéticos duros ou mole é bem estabelecido na literatura. De acordo com Costa *et al.*, (2015) as ferritas duras são consideradas magnetos permanentes, ou seja, materiais difíceis de serem magnetizados e desmagnetizados, retendo a magnetização mesmo depois da remoção do campo magnético. As ferritas moles são materiais considerados magnetos não permanentes ou de alta permeabilidade, ou seja, materiais que são facilmente magnetizados e desmagnetizados. Interessante ressaltar que a ferrita de CoFe₂O₄ é a única ferrita do tipo espinélio inverso que apresenta comportamento de material magnético duro ou seja, que apresenta valor da coercividade na ordem de 2,5 × 10⁴ Oe (O'handley, 1942). Todas as demais ferritas dessa classe se comportam com material magnético mole.

Analisando o comportamento das NPM's em estudo após o revestimento com TEOS e com TEOS e APTS simultaneamente, verifica-se de forma geral que o comportamento foi o mesmo, ou seja, houve uma redução da magnetização de saturação após o revestimento. Para a amostra CoF (amostra revestida com TEOS e APTS) essa redução foi de 11,50, 1,25% e para a amostra FeF a redução foi de 11,26 e 24,92%, quando comparadas as NPM's sem revestimento e NPM's revestidas apenas com o TEOS, porém apesar da redução na magnetização de saturação o comportamento ferrimagnético do material foi mantido. Os valores no campo desmagnetizante (campo coercitivo, Hc) praticamente se mantem inalterados. Isso é muito importante, pois indica que o revestimento não compromete o magnetismo das NPM's. Esse comportamento também foi oservado e reportado por outros pesquisadores quando avaliaram a aplicação de NPM's como biosensores, como pode ser visto a seguir.

É importante ressaltar que altos valores de magnetização de saturação é um dos pré-requisitos para maximizar a eficiência de segmentação de nanopartículas usando um campo magnético externo. Considerando todos os resultados observa-se que todas as NPM's possuem propriedades magnéticas suficientes para exibir uma resposta magnética suficientemente alta para direcionar as partículas para um local específico no corpo. Assim sendo, diversos autores reportam a aplicação de NPM's e NPM's @SiO₂ na área biomédica, com propriedades magnéticas promissoras.

Hong et al., (2009)quando prepararam е caracterizaram nanopartículas revestidas de sílica usando Fe₃O₄ como precursor de ferrofluidos, observaram a partir dos resultados obtidos que a magnetização de saturação diminuiu e apresentou valores de: 39,29, 80,51 e 85,80 % na medida em que as NPM's de Fe₃O₄ foram modificadas com citrato de sódio, SiO₂ e ácido oleico (magnetização de saturação apresentou valores de (Ms) 69,86, 42,41, 13,611 e 9,918 emu/g, respectivamente). Os autores atribuíram a diminuição da magnetização de saturação ao aumento do tamanho das partículas de Fe₃O₄ após serem modificadas com citrato de sódio, SiO₂ e ácido oleico.

Wang *et al.*, (2011) prepararam NPM's de CoFe₂O₄ monodispersas em SiO₂, e em seguida, funcionalizaram com amino com a finalidade de imobilização de enzimas e observaram que a magnetização de saturação diminuiu de 31,53 % após as NPM's serem funcionalizadas com SiO₂ e atribuíram essa diminuição ao efeito da camada de revestimento com sílica amorfa sobre as NPM's.

Tang *et al.*, (2012) quando estudaram o compósito Co_{0.8}Ni_{0.2}Fe₂O₄/PVP usando o agente de acoplamento silano metacrilato de 3-(trimetoxissilil), reportaram que a magnetização de saturação observada para o compósito Co_{0.8}Ni_{0.2}Fe₂O₄/PVP foi menor quando comparado com as NPM's de Co_{0.8}Ni_{0.2}Fe₂O₄. Essa redução na magnetização de saturação foi atribuída à presença do PVP, o qual não é magnético e influenciou a uniformidade ou magnitude da magnetização por extinguir o momento magnético da superfície.

Wu *et al.*, (2013), quando sintetizaram nanoestruturas de Fe₃O₄@SiO₂ TiO₂ e Ftalocianina (CoPcS). Os autores observaram que após o revestimento

130

com SiO₂, TiO₂ e CoPcS, a magnetização de saturação da Fe₃O₄ de (58,3 emu g⁻¹) decresceu. No entanto, o magnetismo Fe₃O₄@SiO₂ e TiO₂@ CoPcS foi ainda suficientemente elevado (35,9 emu g⁻¹) para aplicação de um campo magnético externo, o que pode facilitar a separação fotocatalítica de soluções tratadas.

Nadeem *et al.,* (2014) quando sintetizaram NPM's de NiFe₂O₄ revestidas com SiO₂ observaram uma redução na magnetização de saturação (Ms) de 48, 27%. Os autores justificaram o efeito da redução da Ms devido a uma desordem mais forte nos spins na superfície das nanopartículas com a presença de SiO₂.

Sadighian *et al.*, (2014), quando avaliaram as propriedades magnéticas das nanopartículas de Fe₃O₄, Fe₃O₄/TEOS/APTES (*core–shell*) e Fe₃O₄ TEOS/APTES - Doxorrubicina-quitosana por um amplificador de amostra de vibração (VSM) obtiveram valores de magnetização de saturação (Ms) de 56; 8,47 e 6 emu/g a 8500 Oe, e suscetiilidade magnética de 0,08, 0,14 e 0,008 emu/g Oe, respectivamente. Os resultados mostraram que todas as amostras exibiram propriedades superparamagnéticas. Os resultados indicam que todas as variantes das NPM's de Fe₃O₄, NPM's de Fe₃O₄ revestidas com TEOS e APTES e Fe₃O₄ TEOS/APTES-Doxorrubicina-quitosana possuem propriedades magnéticas suficientes para exibir uma resposta magnética suficientemente alta para direcionar as partículas para um local específico no corpo.

Zhang *et al.*, (2015) reportaram a síntese do nanocompósitos Fe₃O₄/SiO₂/hidroxiapatita para aplicação fotocatalítica e observaram mediante os resultados obtidos que a saturação magnética apresentou valores (Ms) de 79,1, 60,3 e 26,7 emu/g para Fe₃O₄, Fe₃O₄/SiO₂ e Fe₃O₄/SiO₂/hidroxiapatita, respectivamente. Os autores atribuíram a diminuição nos valores de (Ms) na ordem Fe₃O₄, Fe₃O₄/SiO₂ e Fe₃O₄/SiO₂ e Fe₃O₄/SiO₂ e Fe₃O₄ /SiO₂ do volume da camada de revestimento não-magnético em relação ao volume total da amostra.

Mediante as curvas de histerese das amostras HJHS, HL, HLC e do γ , Figura 49c e 49d, observa-se de forma geral para as três amostras ciclos M x H que apresentam dois comportamentos simultâneos, ou seja, ferromagnético para baixo campo (< 5 Oe) e diamagnético para alto campo (> 5 Oe) aplicado. Para o fármaco (γ), a transição do comportamento ferromagnético para diamagnético ocorreu em torno de 3 Oe. Esse comportamento é inerente da composição química da HAp que é conhecida como um óxido não magnético, ou seja, diamagnético.

Segundo Kuda *et al.*, (2009) quando avaliaram o efeito da incorporação de Fe, Fe₃O₄ ou Cu sobre as propriedades magnéticas de compósitos vidro/HAp para aplicações biológicas afirmaram que essa propriedade pode ser simplesmente relatada como característica diamagnética típica da composição química inerente da HAp em estudo. Porém, Limaye *et al.*, (2011) em seus estudos quando avaliaram a obtenção de semicondutores magnéticos diluídos (SMDs) também relatou esse mesmo comportamento para amostras de ZnO pura. Os autores atribuíram o comportamento ferromagnético do ZnO puro para baixos valores de campo aplicado a interação de troca entre spins de elétrons localizados resultante de vacâncias de oxigênio presentes na superfície das nanopartículas. Para altos valores de campo essas interações cessam ocorrendo a transição para um comportamento diamagnético.

Todos os parâmetros magnéticos (magnetização de saturação-Ms, magnetização remanente - Mr, campo coercivo – Hc) determinados a partir da curva de M x H (magnetização em função do campo aplicado) estão descritos para todas as amostras em estudo na Tabela 19.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 19, verificou-se que a hidroxiapatita sintetizada (HL), a hidroxiapatita de laboratório calcinada (HLC), a comercial (HJHS) e o fármaco (γ) apresentam valores de magnetização de saturação muito baixos, típicos de materiais que apresentam comportamento diamagnético e paramagnético, ou seja, que não saturam. Em relação as NPM's de Fe₃O₄ revestidas com o TEOS e com o TEOS e APTS simultaneamente, amostras estas designadas por FeF, FeFT e FeFS, respectivamente, observa-se uma redução de 11,26 % e 24,92 % da magnetização de saturação das amostras FeFT e FeFS quando comparada com NPM's sintetizadas de Fe₃O₄ (FeF).

Amostras	<i>M</i> s (emu/g)	<i>Mr</i> (emu/g)	Hc (Oe)	Mr/Ms
HJHS	0,07*	0,02	168,23	0,28
HL	0,13*	0,03	265,43	0,23
HLC	0,6*	8,3	77,3	
γ	0,05*	0,01	160,75	0,2
CoF	33,65	12,55	1200,17	0,37
CoFT	29,78	11,13	1216,74	0,37
CoFS	33,23	12,71	1231,02	0,38
FeF	47,15	9,95	234,43	0,21
FeFT	41,84	8,88	242,16	0,21
FeFS	35,40	7,47	252,88	0,21

Tabela 19 - Parâmetros magnéticos referentes para as amostras em estudo antes e após revestimento com o TEOS e o TEOS e APTS simultaneamente.

* - Magnetização máxima (M_{max}).

No que diz respeito às NPM's de CoFe₂O₄ observa-se que houve uma redução na magnetização de saturação de 11,50 % e de 1,25 % das amostras após revestidas com TEOS e com o TEOS e APTS simultaneamente, (CoFT e CoFS) respectivamente, quando comparadas com às NPM's sintetizadas de CoFe₂O₄ (CoF).

Com base nestes resultados, observa-se que, para as NPM's em estudo, mesmo após o revestimento com o TEOS e APTS precursores da SiO₂ estas mantiveram suas características magnéticas, ou seja, as NPM's continuaram sendo fortemente atraídas pelo campo magnético, indicando, assim, a obtenção de um material híbrido com características magnéticas promissoras para uso na biomedicina como carreador de fármaco.

4.2 Etapa II – Compósitos híbridos (carreadores de fármaco)

4.2.1 Difração de Raios X (DRX)

Na Figura 50, encontram-se ilustrados os difratogramas de raios X dos híbridos CoFe₂O₄@ SiO₂: γ (C γ) e Fe₃O₄@SiO₂: γ (F γ).

Mediante a Figura 50a, observa-se a formação da fase da ferrita $CoFe_2O_4 e Fe_2O_3$ (hematita) e traços da magnetita Fe_3O_4 identificados mediante as fichas cristalográficas JCPDF 22-1086, JCPDF 33-0664 e JCPDF 88-0315 respectivamente. Por meio da Figura 50b, para o híbrido $Fe_3O_4@SiO_2:\gamma$ ($F\gamma$),

observa-se a formação da fase principal referente a Fe₃O₄ (μ) identificada mediante a ficha JCPDF 88-0315 e picos de traços da segunda fase referente a hematita Fe₂O₃ (η), identificada pela ficha padrão JCPDF 33-0664.

Pode-se observar para os difratogramas do híbrido $CoFe_2O_4@SiO_2:\gamma$ (C γ) e Fe₃O₄@SiO₂: γ (F γ), a presença de picos com alta intensidade e elevada largura basal para todas as reflexões, demonstrando a cristalinidade da amostras e sua característica nanoestrutural.



Figura 50 - DRX (a) padrão da CoFe₂O₄, da Fe₂O₃ e da e da Fe₂O₃ e DRX da amostra (C γ); (b) padrão da Fe₃O₄ e da Fe₂O₃, e DRX da amostra (F γ).

Para o híbrido CoFe₂O₄@SiO₂ (C γ) não foi observado picos referente ao fármaco (γ) entretanto, para o híbrido Fe₃O₄@SiO₂ (F γ) Figura 50b, estes picos foram observados em 18,34, 19,21 referente a fase (λ)C₁₅H₁₂CIN₃O e em 40,94° referente (ϕ) C₁₁H₁₆N₃O₂ conforme pode ser observado na Figura 38b para o fármaco. Esse resultado denota que as NPM's hibridizadas de Fe₃O₄ conjugaram com maior eficiência o fármaco que as NPM's de CoFe₂O₄.

Por meio da Figura 44, ilustra-se os difratogramas de raios X dos compósitos híbridos CoFe₂O₄@SiO₂:HAp (HC) e Fe₃O₄@SiO₂:HAp (HF). Podese observar, na Figura 44a, para o compósito híbrido CoFe₂O₄@SiO₂:HAp (HC) a presença de quatro fases, sendo a fase principal da HAp $Ca_5(PO_4)_3OH$, de acordo com a ficha padrão JCPDF 09-0432 e segunda fase de traços da $CoFe_2O_4$, correspondente a ficha cristalográfica JCPDF 22-1086, Fe_2O_3 referente a ficha cristalográfica 33-0664 e picos referentes a Fe_3O_4 em 62,63; 57,21 e 43,20° correspondentes a ficha cristalográfica 88-0315.

Por meio da Figura 44b, do compósito híbrido Fe₃O₄@SiO₂:HAp (HF) observa-se a presença da fase principal da Fe₃O₄ de acordo com a ficha cristalográfica JCPDF 88-0315 e picos de segunda fase correspondente a HAp Ca₅(PO₄)₃OH, de acordo com a ficha padrão JCPDF 09-0432 e traços da Fe₂O₃ de acordo com a JCPDF 33-0664. Para ambas as amostras pode-se observar a presença de picos com alta intensidade e elevada largura basal para todas as reflexões, demonstrando a cristalinidade das amostras e sua característica nanoestrutural.

Como reportado na Tabela 11, ambos os compósitos híbridos exibidos nos difratogramas da Figura 51a e 51b foram sintetizados nas mesmas propororções HAp:NPM's, com predominância da HAp (70%) em relação as NPM's (30%). Entretanto, a presença da fase principal da HAp no híbrido CoFe₂O₄@SiO₂:HAp (HC) e da Fe₃O₄ no híbrido Fe₃O₄@SiO₂:HAp (Fγ) possivelmente ocorreu devido ao fato de que as NPM's hibridizadas de Fe₃O₄ tenha incorporado com maior eficiência a HAp, quando comparado as NPM's de CoFe₂O₄.



Figura 51 - DRX (a) padrão da HAp, da CoFe₂O₄, Fe₂O₃ e DRX da amostra (HC); (b) padrão da HAp, Fe₃O₄ e da Fe₂O₃, e DRX da amostra (HF).

Na Figura 52, encontra-se ilustrados os difratogramas de raios X dos compósitos híbridos HJCoFSγ₁; HCoFSγ₁; HCoFSγ₂ e HCoFSγ₃ e HJFeFSγ₁, HFeFSγ₁, HFeFSγ₂ e HFeFSγ₃.

Pode-se observar nos difratogramas da Figura 52a para o compósito híbrido sintetizado com a hidroxiapatita comercial da JHS Biomateriais (HJCoFS γ_1) na concentração de 70:30 HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ e nos sistemas HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 nas concentrações de 70:30; 50:50 e 30:70 de forma geral, a presença de quatro fases, sendo a fase principal da HAp Ca₅(PO₄)₃OH, de acordo com a ficha padrão JCPDF 09-0432 e segunda fase de traços da CoFe₂O₄, Fe₂O₃ correspondentes as fichas cristalográficas JCPDF 22-1086, 33-0664 e picos da Fe₃O₄ em torno 62,63; 57,21 e 43,20° referentes a Fe₃O₄ correspondentes a ficha cristalográfica 88-0315.

Observa-se ainda, a presença de picos com alta intensidade e elevada largura basal para todas as reflexões, demonstrando a cristalinidade das amostras e sua característica nanoestrutural. Entretanto, a medida que diminuise a concentração HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ 70:30; 50:50 e 30:70 observa-se que, diminui a intensidade dos picos da HAp, aumentando-se as intensidades dos picos referentes as NPM's hibridizadas e ausência de picos referentes ao fármaco. A ausência de picos correspondentes ao fármaco está em concordância com o difratograma da Figura 50a do híbrido CoFe₂O₄@SiO₂:γ (Cγ).

Mediante o difratograma da Figura 52b, para o compósito híbrido sintetizado com a hidroxiapatita comercial da JHS Biomateriais (HJFeFS γ_1) na concentração de 70:30 HAp:Fe₃O₄@SiO₂ e nos sistemas HFeFS γ_1 ; HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 nas concentrações de 70:30; 50:50 e 30:70. De forma geral, para todos os sistemas pode-se observar a presença de três fases, da Fe₃O₄ de acordo com a ficha cristalográfica JCPDF 88-0315 e picos correspondente a HAp Ca₅(PO₄)₃OH, de acordo com a ficha padrão JCPDF 09-0432 e traços da Fe₂O₃ de acordo com a JCPDF 33-0664.

Esse resultado corrobora com os resultados expostos na Figura 44b, para o compósito híbrido Fe₃O₄@SiO₂:HAp (HF). Entretanto, a presença da fase principal da HAp foram constatadas apenas para os compósitos híbridos HJFeFSγ1 apresentam concentração HFeFSγ1 е que de 70:30 HAp:Fe₃O₄@SiO₂ Para os compósitos híbridos HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 de concentração 50:50 e 30:70 HAp:Fe₃O₄@SiO₂ a fase principal foi referente a Fe₃O₄. Foram observados ainda, para todos os compósitos híbridos picos referentes ao fármaco em torno 18,31 e 42,09º referente a fase (λ)C15H12CIN3O e em 40,94° referente a fase (ϕ) C₁₁H₁₆N₃O₂ conforme pode ser observado na Figura 32b para as fichas padrão do fármaco. A presença dos picos referentes ao fármaco corroboram com os resultados do híbrido Fe₃O₄@SiO₂ (Fy) Figura 50b.



Figura 52 - DRX (a) padrão da HAp, da CoFe₂O₄, Fe₂O₃ e DRX dos compósitos híbridos HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 ; (b) padrão da HAp, Fe₃O₄ e da Fe₂O₃, e DRX dos compósitos híbridos HJFeFS γ_1 , HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 .

A Tabela 20, exibe os dados estruturais de cristalinidade e tamanho de cristalito para o pico de maior intensidade (311) – primeira ordem de difração - obtidos a partir dos resultados de DRX para os híbridos CoFe₂O₄@SiO₂:γ (Cγ); Fe₃O₄@SiO₂:γ (Fγ); HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ (HC), HAp:Fe₃O₄@SiO₂ (HF) e dos compósitos híbridos HJCoFSγ₁; HCoFSγ₁; HCoFSγ₂ e HCoFSγ₃ e HJFeFSγ₁, HFeFSγ₁, HFeFSγ₂ e HFeFSγ₃.

De acordo com a tabela 20, observa-se que, a cristalinidade e o tamanho de cristalito dos compósitos híridos $CoFe_2O_4@SiO_2$ (C γ) e $Fe_3O_4@SiO_2$ (F γ) se mantiveram praticamente semelhantes. Bem como, os compósitos híbridos HAp:CoFe_2O_4@SiO_2 (HC), HAp:Fe_3O_4@SiO_2 (HF).

intensidade (311) para os	híbridos CoFe₂O₄@SiO	D_2 (C _Y) e Fe ₃ O_4 @SiO ₂ (F _Y);
HJCoFSy1: HCoFSy1: HCoFS	5_{2} e HCoFS $_{3}$ e HJFeFS $_{1}$. HFeFSy ₁ . HFeFSy ₂ e HFeFSy ₃
Amostras	Cristalinidade (%)	Tamanho de Cristalito (nm)
Ο γ	66,00	31,00
Fγ	65,00	31,00
HC	76,40	54,10
HF	75,17	37,68
HJCoFSγ1	90,40	69,70
HCoFSγ1	74,99	51,14
HCoFSγ2	89,70	37,32
HCoFSγ ₃	86,90	37,49
HJFeFSγ₁	88,90	63,88
HFeFSγ₁	87,80	68,13
HFeFSγ₂	89,70	36,21
HFeFSγ₃	86,90	37,50

Tabela 20 - Cristalinidade, tamanho de cristalito em relação ao pico de maior

Os compósitos híbridos HJCoFS₇₁; HCoFS₇₁; HCoFS₇₂ e HCoFS₇₃ e HJFeFS₇₁, HFeFS₇₁, HFeFS₇₂ e HFeFS₇₃ por sua vez, apresentaram valores de cristalinidade e tamanho de cristalito do pico principal, muito próximos, sendo que, todos os compósitos apresentaram característica nanocristalina promissora para aplicação como carreadores de fármaco no tratamento da osteomielite.

4.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Na Figura 53 encontram-se os espectros vibracionais na região do infravermelho, na faixa de 4000 – 500 cm⁻¹ dos híbridos CoFe₂O₄@SiO₂: γ (C γ) e Fe₃O₄@SiO₂: γ (F γ).



Figura 53 - FTIR dos híbridos CoFe₂O₄@SiO₂: γ (C γ) e Fe₃O₄@SiO₂: γ (F γ).

Verifica-se nos espectros de infravermelho da Figura 53a e 53b e na Tabela 20 a presença de modos vibracionais da sílica em torno de 726,67; 730 e 1000 e 1100 cm⁻¹ correspondentes às vibrações v_{σ} (Si-O-Si) e $v_{\alpha\sigma}$ (Si-O-Si), respectivamente. As vibrações originárias da absorção de moléculas de água na região de 3400-3500 cm⁻¹ também foram observadas. Estas vibrações indicam a presença de grupos -OH na superfície das NPM's e, também, da água remanescente na síntese. Esses grupos –OH se ligam ao Sílicio do TEOS e APTS, formam grupos Si-OH. As bandas em torno de 2390 cm⁻¹ são referentes a defeitos da SiO₂ que revestem o núcleo magnético das NPM's.

Defeitos da sílica também foram reportados por Vinod *et al.*, (2003) ao estudarem polímeros organossilânicos, a banda observada em 2350 cm⁻¹ foi atribuida a defeitos na superfície da sílica. Outra banda fraca de absorção pode ser observada em volta de 1378 cm⁻¹ atribuída à vibração da ligação N-O decorrente do nitrato usado para obtenção das NPM's, grupo este presente no produto da reação de combustão. Vibrações de Fe-O e Co-O foram observados nos espectros das Figuras 53a e 53b foram observadas em 540 e 568 cm⁻¹ confirmando a fase da CoFe₂O₄ no híbrido (C_Y) e da Fe₃O₄ no híbrido (F_Y).

A constatação da estrutura *core-shell* em que, o núcleo magnético é formado pelas NPM's de $CoFe_2O_4 e Fe_3O_4$ deu-se pela presença de grupos -O-Si-O- em torno de 836; 568 e 540 cm⁻¹ que se ligam ao Fe e Co formando grupos Fe-Si-O e Co-Si-O. As demais atribuições observadas nos espectros das Figuras 40a e 40b e Tabela 15, são referentes ao fármaco essa

constatação corrobora com o espectro da Figura 42b e Tabela 16.

A Tabela 21, exibe o espectro de FTIR dos híbridos CoFe₂O₄@SiO₂: γ (C γ) e Fe₃O₄@SiO₂: γ (F γ).

Ογ		Γγ		
Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de absorção	Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de absorção	
2886	CH ₂ -CH ₃	2915	CH ₂ -CH ₃	
2722	CH ₂ -N	2724	CH ₂ -N	
2340	Defeitos da SiO ₂			
1732; 1624;3400	Si-OH	2506	COOH	
1455	CH₃ e C-X (X=F, Cl)	2338	Defeitos da SiO ₂	
1378	NO	1455	CH ₃ e C-X (X=F, CI)	
1332	C-X (X=F, CI)	1370	CH ₂ e C-X (X=F, CI)	
1284; 1302	COOH; C-F	1303; 1251	CH ₃ ; C-F	
1215; 1253		1166	CH ₃ -F ₃	
1163	C-N; C-F	1103	C-N; C-F	
1044	ν _{ασ} Si-O-Si	1043;1001	$v_{\alpha\sigma}$ Si-O-Si	
836	Fe-O-Si	979;3450	C-X (X=F, CI) e Si- OH	
568	Co-O-	888	RCH=CH ₂	
	_	839	Benzeno monossubstituido	
		726,67; 730	v_{σ} Si-O-Fe	
	_	698	Benzeno monossubstituido	
		540	Fe-O e Co-O	

Tabela 21 - Número de onda e bandas de absorção referente aos híbridos $CoFe_2O_4@SiO_2$; γ (C γ) e Fe₃O₄@SiO₂; γ (F γ).

Por meio da Figura 54a e 54b e a Tabela 22, encontram-se os espectros vibracionais na região do infravermelho, bandas e número de onda na faixa de 4000–500 cm⁻¹ dos compósitos híbridos HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ (HC) e HAp:Fe₃O₄@SiO₂ (HF). Observa-se a presença de bandas vibracionais de agrupamentos PO₄³; CO₃⁻² típicas da hidroxiapatita HAp, resultado que corrobora com os espectros da Figura 34. As bandas referentes ao Co-O; Fe-O confirmam a formação da CoFe₂O₃ e Fe₃O₄. Enquanto que, os grupos OH se ligam ao Si formando grupos Si-OH. Porém, tanto o Co- quanto o Fe- se ligam ao Si- do TEOS e APTS confirmando a formação de estruturas *core-shell*, como discutido nos espectros da Figura 40.



Figura 54 - FTIR dos compósitos híbridos HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ (HC), HAp:Fe₃O₄@SiO₂ (HF).

A Tabela 22 evidencia os valores relativos ao comprimento de onda e bandas de absorção referente aos compósitos híbridos HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ (HC), HAp:Fe₃O₄@SiO₂ (HF).

НС		HF		
Número de onda (cm⁻¹)	Banda de absorção	Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de absorção	
2358	Si-OH	2908	CH ₂ -CH ₃	
2076;1996	C-H	2726	CH ₂ -N	
1458;1416;961;871; 614; 600; 617	CO ₃ -2	_	_	
794	Fe-O	2338	Defeitos da SiO ₂	
558	Co-O	1455	CH₃	
		1387	PO ₄ -3 e CH ₂	
		1307; 1253	CH ₃ ; NO ₂	
		1179	CH₃	
		1098	Si-O-Si	
		996; 976	Si-OH	
		889;840	CO ₃ -2	
		839; 805;763	Si-O-Fe	
		701,628; 730; 600 e 562	Si-O-Fe	
		2908	CH ₂ -CH ₃	
		2726	CH ₂ -N	

Tabela 22 - Número de onda e bandas de absorção referente aos HAp:CoFe₂O₄@SiO₂ (HC), HAp:Fe₃O₄@SiO₂ (HF)

Na Figura 55, encontram-se os espectros vibracionais na região do infravermelho, na faixa de 4000 – 500 cm⁻¹ dos compósitos híbridos HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 e HJFeFS γ_1 , HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 .

Por meio dos espectros da Figura 55 e Tabela 23, observa-se a presença de bandas da HAp cujas flexões principais ocorrem nas flexões de maior intensidade de grupos agrupamentos PO₄-³; CO₃-². As bandas referentes ao Co-O; Fe-O confirmam a formação da CoFe₂O₃ e Fe₃O₄. Enquanto que, os grupos OH se ligam ao Si formando grupos Si-OH. As demais bandas são referentes ao fármaco como pode ser observado no espectro de FTIR para o fármaco, Figura 42 e Tabela 16.



Figura 55 - FTIR dos compósitos híbridos HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 (a) e HJFeFS γ_1 , HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 (b).

A Tabela 23, exibe o número de onda e as bandas de absorção referente aos compósitos híbridos HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 e HJFeFS γ_1 , HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 .

Tabela 23 - Número	de onda e band	las de absorção	referente aos	compósitos híbridos
HJCoFSγ ₁ ; HCoFSγ ₁	; HCoFS ₂ e HC	CoFS _{γ3} e HJFeF	Sγ ₁ , HFeFSγ ₁ ,	HFeFSγ ₂ e HFeFSγ _{3.}

HJCoFSγ ₁ ; HCoFSγ ₁ ; HCoFSγ ₂ ; HCoFSγ ₃		ΗJFeFSγ ₁ ; ΗFeFSγ ₁ ; ΗFeFSγ ₂ ; ΗFeFSγ ₂		
Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de absorção	Número de onda (cm ⁻¹)	Banda de absorção	
3568-3574	O-H; Si-OH	3576	O-H; Si-OH	
2900	CH ₂ -CH ₃	2932	CH ₂ -CH ₃	
1625	C=O	2353	Defeitos da SiO ₂	
1580	CO3-2	1631	C=O	
1525	C-0	1580;1450;1490	C-0	
1472; 1375;1330	C-X (X=F, CI)	1378;1300;1255	CH ₃ -F ₃	
1300	COOH; C-F	897	RCH=CH ₂	
1035	Si-O-Si	820; 839	Benzeno	
840-740	Si-OH	800;767;689	Si-OH	
632;594;568	PO4 ⁻³	696	PO4 ⁻³	
470	Co-O	631;598;566	Si-O-Fe	
		494	Fe-O	

Por meio da Tabela 23, observa-se a presença de bandas da HAp cujas flexões ocorreram para os agrupamentos PO₄³ e CO₃⁻². As bandas referentes ao Co-O; Fe-O confirmam a formação da CoFe₂O₃ e Fe₃O₄. Enquanto que, os grupos OH se ligam ao sílicio, formando grupos Si-OH e grupos Si-O-Si, referentes a SiO₂. As demais bandas são referentes ao fármaco.

4.2.3 Análise Textural por Adsorção de Nitrogênio (BET)

Na Tabela 24, encontram-se os valores de área superficial específica (S_{BET}) , tamanho de partícula (D_{BET}) , volume do poro (V_p) , diâmetro do poro (Dp) e a relação entre o tamanho de partícula e o tamanho de cristalito (Tc), referente as amostras em estudo. O cálculo dos valores de volume de poro (V_P) e diâmetro de poro (D_P) das amostras exibidos na Tabela 24 se encontram no Apêndice D e E.

Comparando-se os valores de área superficial, descritos na Tabela 24 observa-se que o híbrido C γ apresenta área superficial superior a F γ . Em relação aos compósitos híbridos HC, HF HCoFS γ_1 , HCoFS γ_2 , HCoFS γ_3 , HJFeFS γ_1 , HFeFS γ_1 e HFeFS γ_2 , HFeFS γ_3 e os compósitos híbridos sintetizados com a hidroxiapatita da JHS Biomateriais HJFeFS γ_1 e HJCoFS γ_1 , observa-se
de forma geral, que houve pequenas alterações na área superficial sendo á área superficial de todos os compósitos (carreadores) suficiente para reagir com células e fluido biológico, onde os compósitos que apresentam maiores diâmetros de partícula e maior volume de poros tendem a permanecer mais tempo no local implantado favorecendo a osteointegração.

Amostras	S _{ВЕТ} (m²g⁻¹)	D _{вет} (nm)	V _P (cm ³ /g ⁻¹)	D _P (nm)	Tc* (nm)	D _{BET} /T _C *
Ϲγ	4,64	326,6	0,01	3,56	31,00	10,53
Fγ	1,57	152,9	0,03	7,83	31,00	4,93
HC	20,21	86,5	0,14	3,37	54,10	1,60
HF	10,23	194,5	0,08	3,36	37,68	5,16
HJCoFSγ1	4,26	47,1	0,05	4,47	69,70	0,67
HCoFSγ1	9,36	366,3	0,03	3,98	51,14	71,62
HCoFSγ ₂	9,10	209,9	0,05	3,83	37,32	5,62
HCoFSγ ₃	8,52	212,1	0,05	3,83	37,49	5,66
HJFeFSγ₁	3,13	636,9	0,56	7,69	63,88	9,97
HFeFSγ₁	6,02	348,0	0,01	3,54	68,13	5,11
HFeFSγ₂	4,95	388,1	0,02	3,97	36,21	10,71
HFeFSγ₃	4,01	456,6	0,02	3,82	37,50	12,18

Tabela 24 - Valores de área superficial específica (S_{BET}), tamanho de partícula (D_{BET}), volume de poro (Vp) e diâmetro de poro (Dp) das amostras em estudo.

*T_C = Tamanho de cristalito

Pela relação D_{BET}/D_{Tc} , observa-se que, os valores são altos, maiores a uma unidade, sendo de característica aglomerada, formada por policristais. A excessão foi o compósito HJCoFS γ_1 que apresentou relação D_{BET}/D_{Tc} , menor a uma unidade. Em relação ao tamanho de poro, observa-se que, todos os compósitos híbridos apresenta mesoporosidade, ou seja, diâmetro de poro compreendido na faixa entre 2 e 50 nm.

4.2.4 Distribuição Granulométrica

Na Figura 56, ilustra-se as curvas de distribuição das partículas equivalente em função do volume cumulativo dos híbridos C γ e F γ . Comparando-se as curvas de distribuição granulométrica observa-se que a curva do híbrido C γ apresenta distribuição de partícula larga, monomodal e assimétrica. Enquanto que o híbrido F γ apresenta uma distribuição de partícula

mais estreita, monomodal e simétrica, o tamanho mediano de partícula (D50%) para os híbridos foi de 79 e 189 nm, respectivamente.



Figura 56 - Distribuição granulométrica dos híbridos: (a) Cγ (b) Fγ.

Na Figura 57, ilustra-se os valores de distribuição dos diâmetros das partículas equivalente em função do volume cumulativo dos compósitos híbridos HC e HF.

Em ambos os compósitos híbridos observa-se uma distribuição larga, assimétrica, monomodal e tamanho mediano de partícula (D50%) de 58 e 54 nm, respectivamente. Entretanto, o compósito híbrido HF apresenta distribuição de partícula um pouco mais larga que o compósito híbrido HC.



Figura 57 - Distribuição granulométrica dos compósitos híbridos: (a) HC (b) HF.

Na Figura 58, são exibidas as curvas de distribuição granulométrica dos compósitos híbridos: HJCoFSγ₁; HCoFSγ₁; HCoFSγ₂ e HCoFSγ₃.

De modo geral, observa-se para todas as curvas, uma distribuição larga, assimétrica, monomodal. A curva que apresenta distribuição mais estreita é a referente ao compósito híbrido HCoFS_{γ3}, que apresenta relação de





Figura 58 - Distribuição granulométrica dos compósitos híbridos: HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 .

A Figura 59 ilustra os valores de distribuição dos diâmetros das partículas equivalente em função do volume cumulativo dos compósitos híbridos HJFeFSγ1, HFeFSγ1, HFeFSγ2 e HFeFSγ3. Para os compósitos híbridos HFeFSγ1, HFeFSγ2 observa-se uma distribuição mais estreita, simétrica e monomodal, já os compósitos híbridos HJFeFSγ1 e HFeFSγ3 apresentam uma distribuição larga, assimétrica e monomodal.





Figura 59 - Distribuição granulométrica dos compósitos híbridos: HJFeFS γ_1 , HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 .

A Tabela 25 expressa o tamanho dos diâmetros das partículas das amostras em estudo de acordo com os índices de distribuição de tamanho de partícula D10, D50 e D90 obtidos a partir das Figuras entre a 56 a 59.

Amostras	D (10 %) nm	D (50 %) nm	D (90 %) nm
Ϲγ	45	79	175
Fγ	30	189	275
HC	32	58	109
HF	30	54	109
HJCoFSγ1	35	68	162
HCoFSγ1	20	37	68
HCoFSγ ₂	27	60	130
HCoFSγ ₃	26	41	72
HJFeFSγ1	38	66	134
HFeFSγ₁	144	205	299
ΗFeFSγ₂	93	133	214
HFeFSγ₃	36	62	124

Tabela 25 - Diâmetros das partículas das amostras de acordo com os índices de distribuição.

Com base nas Figuras, 56-59 e os valores reportados na Tabela 25, observa-se que, entre os compósitos híbridos sintetizados com a CoFe₂O₄@SiO₂ o compósito híbrido que apresentou distribuição mais estreita foi o HCoFS_{γ3}. E entre os compósitos híbridos sintetizados com a Fe₃O₄@SiO₂ pode-se observar uma distribuição mais estreita para os compósitos híbridos HFeFS_{γ1}, HFeFS_{γ2}. Além disso, o diâmetro médio das partículas dos compósitos híbridos sintetizados com a Fe₃O₄@SiO₂ apresentaram-se maiores que os compósitos produzidos com a CoFe₂O₄@SiO₂, visto que os híridos e compósitos híbridos sintetizados com as NPM's de Fe₃O₄ são mais esponjosos devido a síntese ter sido usada a glicina como combustível o que corrobora com os resultados de tamanho de cristalito do pico de maior intensidade, evidenciados nos difratogramas de DRX, distribuição granulométrica e análise morfológica reportados anteriormente e discutidos de forma particular nos resultados de cada análise.

De acordo com Conz *et al.,* 2010 e Maia *et al.,* 2010 o comportamento do material de enxerto particulado depende, em parte, do tamanho das partículas e da sua distribuição granulométrica. A área da superfície disponível para reagir com células e fluido biológico é diretamente proporcional ao cubo do tamanho da partícula do biomaterial. Uma variação estreita no tamanho das partículas é crucial para a promoção da diferenciação celular através do material de enxerto, permitindo assim uma vascularização adequada.

Em contrapartida, a grande variação no tamanho entre as partículas tende a não deixar espaço residual, obstruindo a passagem de células e vasos, dificultando a reparação. Por outro lado, a pequena variação entre as partículas, promove uma maior reabsorção com a diminuição do tamanho das partículas e com o aumento da área superficial específica. Se materiais de composição química idêntica forem considerados, o material com partículas maiores permanecerá mais tempo no local implantado. Dessa forma, o tamanho das partículas, sua forma e a aspereza da superfície também podem afetar a adesão e a proliferação celular sobre o material.

149

4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As Figuras 60a e 60b ilustram as morfologias referente aos híbridos C γ e F γ . Para a morfologia do híbrido C γ , Figura 60a, observa-se a distribuição de aglomerados de tamanho irregular e inferior a 10 µm. Esses aglomerados são constituídos por partículas pequenas que estão interconectadas por interações fracas (partículas não apresentam pré sinterizadas, ou seja, formação de pescoço interpartícula). Resultado que foi observado no MEV referentes as NPM's de CoFe₂O₄, dispostos na Figura 46. Estes aglomerados apresentam baixa porosidade interpartícula e observa-se a formação de poucos poros distribuídos em toda a amostra.

Para a micrografia da Figura 60b, referente ao híbrido F γ , observa-se a formação de aglomerados esponjosos de formato irregular e tamanho maiores e menores a 10 µm como reportado no MEV da Figura 40, esses aglomerados estão interconectados a partículas pequenas, nos quais estes se encontram na forma de novelos do fármaco.



Figura 60 - MEV do híbrido: (a) Cy e (b) Fy.

A Figura 61a e 61b exibe a morfologia dos compósitos híbridos HC e HF. Pode-se observar na Figura 61a, aglomerados na forma de novelos constituídos por partículas pequenas na forma hexagonal que estão interconectadas, havendo a formação de pescoço interpartícula. Na morfologia da Figura 61b, observa-se uma distribuição mais larga de aglomerados de formato irregular e na forma de novelos. Ambos os compósitos apresentam pouca porosidade inter partícula.



Figura 61 - MEV dos compósitos híbridos: (a) HC (b) HF.

Por meio da Figura 62 pode-se observar os MEV's dos compósitos híbridos: HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 . Na Figura 62a para o compósito híbrido HJCoFS γ_1 observa-se a presença de aglomerados de tamanho irregular na forma de novelos e hexagonais bem conectados com pouca porosidade inter partícula. Na Figura 62, para os compósitos híbridos HCoFS γ_1 , observa-se de forma geral a presença de aglomerados na forma de placa, ou agulha típica da hidroxiapatita calcinada e aglomerados de formato de novelos de tamanho e formato irregular.



Figura 62 - MEV dos compósitos híbridos: HJCoFS₇₁; HCoFS₇₁; HCoFS₇₂ e HCoFS₇₃.

A figura 63 exibe as micrografias dos compósitos híbridos (a) $HJFeFS\gamma_1$, (b) $HFeFS\gamma_1$, (c) $HFeFS\gamma_2 e$ (d) $HFeFS\gamma_3$.

Observa-se de modo geral, a formação de aglomerados esponjosos de formato irregular e tamanho maiores que 10 µm. Esse comportamento é típico de materiais formados com glicina (Fe₃O₄) que durante o processo de síntese de combustão apresenta maior liberação dos gases.



Figura 63 - MEV dos compósitos híbridos: (a) HJFeFS γ_1 , (b) HFeFS γ_1 , (c) HFeFS γ_2 e (d) HFeFS γ_3 .

A presença de poros presentes nas amostras são importantes para aplicações biomédicas ortopédicas, pois favorece a adesão entre o tecido ósseo neoformado e a hidroxiapatita sintética, ou seja, osseointegração. Uma vez que, como reportado anteriormente a hidroxiapatita promove um aumento da regeneração óssea ao redor de implantes, onde a mineralização inicia-se pela dissolução de íons cálcio e fosfato. Ao mesmo tempo, a hidroxiapatita mantém a estrutura de suporte, como arcabouço, para os osteoblastos e para a adesão do osso (Conz *et al.*, 2010 e Maia *et al.*, 2010).

4.2.7 Medidas Magnéticas

Nas Figuras, de 64 a 67 ilustra-se o comportamento da magnetização (*M*) em função do campo magnético aplicado (*H*) por meio do laço de histerese para os híbridos C γ e F γ ; Para os compósitos híbridos HC, HF; HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 e HJFeFS γ_1 , HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 . Todas as amostras foram feitas em triplicatas e apresentaram curvas sobrepostas, ou praticamente sobrepostas.

Podemos observar, de forma geral, para todas as histeres, um comportamento típico de materiais ferrimagnéticos, com formação de um laço (curva) de histerese bem definido, conforme reportado na Figura 49a e 49b.

Entretanto, a diferença entre essas duas NPM's está no tipo de material magnético. A magnetita (Fe₃O₄) é um material magnético mole a ferrita de CoFe₂O₄ é um material magnético duro "hard" que magnetiza e desmagnetiza apresentando um ciclo mais largo de histerese magnética. Assim, os compósitos obtidos com cada NPM's apresenta as mesmas características magnéticas das NPM's hibridizadas.



Figura 64 - Curvas de histerese do híbrido: (a) $C\gamma$ (b) $F\gamma$.







Figura 66 - Curvas de histerese dos compósitos híbridos: HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 .



Figura 67 - Curvas de histerese dos compósitos híbridos: HJFeFS γ_1 , HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 .

Todos os parâmetros magnéticos (magnetização de saturação-Ms, magnetização remanente - Mr, campo coercivo – Hc) determinados a partir da curva de M x H (magnetização em função do campo aplicado) estão descritos para todas as amostras na Tabela 26.

$\Gamma \Gamma \Gamma \Gamma S \gamma_1, \Gamma \Gamma \Gamma S \gamma_1$	$5\gamma_2 e \pi rer 5\gamma_3$			
Amostra	M _s (emu/g)	M _R (emu/g)	H _c (G)	Mr/Ms
Ϲγ	30,00	11,00	1216,00	3,67
Fγ	32,90	7,013	260,32	0,21
HCoFSγ _{1B}	9,65	3,715	1253,73	0,38
HCoFSγ _{2B}	12,84	4,832	1219,75	0,38
HCoFSγ _{3B}	17,39	6,533	1224,98	0,37
HC₂	13,00	4,830	1219,70	0,381
HF ₂	12,81	2,937	256,47	0,23
ΗFeFSγ _{1B}	9,74	2,148	257,34	0,22
ΗFeFSγ _{2B}	18,90	4,200	254,00	0,22
HFeFeSγ _{3B}	27,70	6,000	253,00	0,22
HJCoFSγ _{1B}	7,93	2,980	1250	0,40
HJFeFSγ _{1B}	12,00	2,730	252	0,23

Tabela 26 - Parâmetros magnéticos referentes para para os híbridos C γ e F γ ; Para os compósitos híbridos HC, HF; HJCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 e HCoFS γ_3 e HJFeFS γ_1 , HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 .

Por meio da Tabela 26, observa-se que a reação de combustão apresenta-se como uma técnica eficiente para produção de NPM's reprodutíveis, não havendo alterações significativas na magnetização apresentando assim, altos valores de magnetização de saturação o que é adequado para aplicação desses compósitos como carreador de fármaco magnético no tratamento da osteomielite.

Em relação aos compósitos híbridos, Cγ, Fγ e HC e HF observa-se que a magnetização de saturação se manteve praticamente a mesma, sem nenhuma diferença significativa na magnetização em relação as NPM's empregadas.

Ao comparar-se os valores de magnetização de saturação (Ms), das amostras HCoFSγ e HFeFSγ nas concentrações de 70:30, 50:50 e 30:70 HAp: NPM's@SiO₂, observa-se que, quanto maior a quantidade de NPM's maiores também os valores de Ms.

Em relação as medidas magnéticas observou-se que a reação de

combustão apresentou-se como uma técnica eficiente para produção de NPM's reprodutíveis. Em que, observou-se de forma geral, altos valores de magnetização de saturação o que é adequado para aplicação desses compósitos como carreador de fármaco no tratamento da osteomielite.

Ao comparar-se os valores de magnetização de saturação (Ms), das amostras HCoFS γ e HFeFS γ nas concentrações de 70:30, 50:50 e 30:70 HAp:NPM's@SiO₂, observou-se que, quanto maior a quantidade de NPM's maiores também os valores de Ms. Entretanto, mesmo na maior concentração HAp:NPM's@SiO₂ foi possível obter-se hidroxiapatita magnética que apresentou propriedades inerentes a HAp de osteocondução e osteointegração

4.3 Etapa III - Citotoxicidade e liberação de fármaco nos compósitos híbridos (carreadores de fármaco).

4.3.1 Procedimento In Vitro – Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade das NPM's de Fe₃O₄, CoFe₂O₄, dos híbridos Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ e da hidroxiapatita (HAp) sintetizada no LaBSmaC, foram realizados no Laboratório Biosintesis P&D do Brasil LTDA em São Paulo – SP de acordo com a parceria estabelecida com a Empresa JHS Laboratório Químico LTDA (JHS Biomateriais).

As NPM's de Fe₃O₄, CoFe₂O₄ dos híbridos Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ e da hidroxiapatita (HAp) foram utilizadas (80 mg) de cada amostra para preparar um extrato de Polietileno de alta densidade (PEAD)-(CN), na concentração de 200 mg/mL, substância de referência para o ensaio de citotoxicidade. Como controle positivo foi utilizado o Látex natural - (CP) e preparado um extrato na concentração de 200 mg/mL. Os extratos foram preparados de acordo com o POP_TEC_002 – Preparação dos Extratos e expostos a *Cell Hamster Ovary*. Linhagem de células utilizada para o ensaio de Citotoxicidade para determinação da viabilidade celular, conforme pode-se observar nas Figuras 68, 69 e 70.

Na Figura 68 e Tabela 27, pode-se observar o resultado da hidroxiapatita em estudo quanto a sua viabilidade celular quando exposta a células de ovário de hamster chinês de linhagem CHO-K1 (ATCC CCL-61), uma vez que a citotoxicidade de uma amostra é determinada pela porcentagem de células que permanecem viáveis, após a exposição da população celular a diversas concentrações do extrato da substância teste (amostra analisada) a hidroxiapatita (HAp) não é citotóxica e a viabilidade celular é superior a 70%.



Figura 68 – viabilidade celular obtidos do extrato 100% das substâncias de referência (CN – PEAD e CP – Látex natural) e hidroxiapatita.

De acordo com o resultado obtido exposto na Figura 68 e Tabela 27, observa-se que, a hidroxiapatita sintetizada no LaBSmaC-UFCG utilizada para obtenção dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco), apresenta-se não citotóxica, com viabilidade celular de 89,7 %.

Tabela	27	-	Valores	de	viabilidade	e celul	ar e	do do	desvio	padrão	das	substâncias	de
referên	cia	(C	N – PE	AD e	e CP – Láte	x natu	ral)	e hio	droxiapa	itita.			

Grupo	Viabilidade Celular (%)
CN (PEAD)	100,40
(Látex natural)-CP	2,40
Hidroxiapatita	89,7±3,4

Na Figura 69 e Tabela 28, apresenta-se a viabilidade celular das NPM's de de CoFe₂O₄ (CoF) e do híbrido CoFe₂O₄@SiO₂ (CoFS) em relação ao (PEAD)- CN e (Látex natural) -CP. Pode-se observar que, tanto as NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) quanto o híbrido CoFe₂O₄@SiO₂ (CoFS) apresenta viabilidade

celular superior a 70 %.



Figura 69 - Viabilidade celular e desvio padrão das substâncias de referência (CN – PEAD e CP – Látex natural) e das NPM's de CoFe₂O₄ (CoF) e do híbridos CoFe₂O₄@SiO₂ (CoFS).

Na Tabela 28, observa-se que o revestimento com TEOS, APTS resulta na formação do *core-shell* ou híbrido CoFe₂O₄@SiO₂ (CoFS), que aumenta ainda mais a viabilidade celular e torna o híbrido com características ainda menos citotóxica, uma vez que a sílica (SiO₂) reveste o núcleo magnético, diminui a tensão superficial das cargas, diminuindo a aglomeração/oxidação e cria pontos de conjugação biólogica, sítios ativos –NH₂, para conjugação com fármaco e biomoléculas.

Tabela 28 - Valores de viabilidade celular e do desvio padrão das substâncias de referência (CN – PEAD e CP – Látex natural) e das NPM's de de $CoFe_2O_4$ (CoF) e dos híbridos $CoFe_2O_4$ @SiO₂ (CoFS).

Grupo	Viabilidade Celular (%)
CN (PEAD)	100,40
(Látex natural)	2,40
CoF	75,3 ± 3,4
CoFs	106,4 ± 4,6

Na Figura 70 são expostas a viabilidade celular das NPM's de Fe₃O₄ (FeF) e do híbrido Fe₃O₄@SiO₂ (FeF), as quais observa-se que, a viabilidade

celular foi superior a 70% e que apresentam características menos citotóxica as NPM's e híbridos formados com a CoFe₂O₄. O que justifica o fato de que entre as NPM's a Fe₃O₄ é mais utilizada para aplicação na medicina, como reportado em seções anteriores na revisão da literatura.



Figura 70 - Viabilidade celular e do desvio padrão das substâncias de referência (CN – PEAD e CP – Látex natural) e das NPM's de de Fe_3O_4 (FeF), e do híbrido Fe_3O_4 @SiO₂ (FeFs).

Na Tabela 29, observa-se que, tanto as NPM's de Fe₃O₄ (FeF), quanto o híbrido Fe₃O₄@SiO₂ (FeF), apresentaram viabilidade celular superior a 70 % e que, o revestimento com a SiO₂ torna o híbrido com características ainda mais promissoras para aplicação como carreadores de fármaco no tratamento da osteomielite, como discutido para os resultados da Tabela 28.

Tabela 29 - Valores de viabilidade celular e do desvio padrão das substâncias de referência (CN – PEAD e CP – Látex natural) e das NPM's de de Fe₃O₄ (FeF), e do híbrido Fe₃O₄@SiO₂ (FeFs).

Grupo	Viabilidade Celular (%)
CN (PEAD)	107,6
(Látex natural)	1,800
FeF	114,0±5,1
FeFs	119,6±6,4

O ensaio de citotoxicidade dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco) por sua vez, foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular &

Bioquímica de fungos e protozoários (LICBfp) da Universidade Federal de São Paulo no Campus de Diadema como descritos a seguir.

Os testes de citotoxicidade foram realizados a fim de avaliar se as substâncias apresentam comportamento citotóxico. É um teste onde células são expostas a substâncias químicas podendo-se obter taxa de morte celular (apoptose) ou taxa de viabilidade celular e prever o potencial tóxico *in vivo* (OECD 129, 2010; OECD 194, 2014). Este teste, permite averiguar os efeitos tóxicos ou anti-proliferativos da amostra teste em culturas celulares. O NR é um corante neutral red vital, responsável por incorporar o corante nas amostras, assim quanto mais intensa a cor na leitura da absorbância maior a viabilidade celular e menor a toxicidade (OECD 129, 2010).

Em conformidade com a ISO 10993-5 (2009) aplicada à biomateriais, a biocompatibilidade e segurança do produto aplicado devem ser testadas. Com relação ao teste de citotoxicidade indireta, o limite máximo para o material ser considerado seguro é de 70 % de viabilidade celular.

Ao analisarmos o perfil citotóxico do solvente (PVA à 20%) empregado, o qual foi utilizado por propiciar a capacidade de dispersar as amostras que por sua natureza não são solúveis nos solventes usualmente empregados nos ensaios de cultura celular como etanol ou DMSO (OECD 129, 2010), foi possível notar que na concentração de 0,2 mg/mL o solvente apresentou citotoxicidade. Na concentração de 0,05 mg/mL a viabilidade celular apresentou-se superior a 100%. Sendo que, em concentrações inferiores a 0,1 mg/mL o PVA à 20 % é considerado seguro, por apresentar viabilidade celular igual e/ou superior a 70%, como pode-se observar na Figura 71.



Figura 71 - Avaliação da citotoxicidade do solvente.

As Figuras 72 à 82 apresentam o perfil citótoxico dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco), avaliados nas concentrações de 0 a 10 mg/mL, por meio dos quais pode-se observar que a concentração segura, na qual a viabilidade celular foi superior a 70 % foi de 0,312 mg/mL para os compósitos híbridos HFeFS_{γ1}, HFeFS_{γ2}, F_γ, HJCoFS_{γ1} e de 0,156 mg/mL para o compósito HCoFS_{γ1}. Na Figura 71, foi possível observar que, o solvente PVA a 20%, utilizado como solvente para dispersar os compósitos híbridos apresentou-se citótoxico para uma concentração 0,2 mg/mL e provavelmente influenciou na viabilidade celular dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco). Outro fator, que deve-se levar em consideração é a falta de compósitos híbridos (carreadores) no solvente, dispersão dos para concentrações mais elevadas é o fato de que, os compósitos híbridos (carreadores) não terem sido esterilizados antes dos ensaios de citotoxidade, in vitro. Visto que, como apresentados anteriormente, as NPM's de Fe₃O₄, CoFe₂O₄, dos híbridos Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ e a hidroxiapatita, utilizadas como precursoras dos compósitos híbridos (carreadores) não apresentaram-se citotóxicas, como descrito em resultados anteriores. Dessa forma, todos esses fatores devem ser levados em consideração e novos ensaios de citotoxidade devem ser realizados de acordo com a otimização dos carreadores de fármaco descritos de forma detalhada como sugestão de trabalhos futuros, detalhado na seção 6.



Figura 72 - Avaliação da citotoxicidade das amostras HFeFS_{γ1}.



Figura 73 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HFeFS_{γ2}.



Figura 74 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HFeFS_{y3.}



Figura 75 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HJFeFS_{γ1}.



Figura 76 - Avaliação da citotoxicidade das amostras F γ



Figura 77 - Avaliação da citotoxicidade da amostra Cy



Figura 78 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HF.



Figura 79 - Avaliação da citotoxicidade das amostras HCoFSγ2.



Figura 80 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HCoFS_{y3}.



Figura 81 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HJCoFSγ₁.



Figura 82 - Avaliação da citotoxicidade da amostra HCoFSγ1.

Por meio dos resultados obtidos, e em conformidade com a OECD 129 (2010) aplicada a avaliação da citotoxicidade de substâncias quimicas, é possível pré determinar a DL50 (concentração capaz de matar 50 % dos animais testados) utilizando um método *in vitro*, poupando dessa forma animais e estando em consonância com as diretrizes atuais de redução de animais na pesquisa de novos medicamentos.

A IC50 permite o calculo da DL50, dessa forma, inferindo quais concentrações devem ser empregadas nos testes toxicológicos como

toxicidade aguda e crônica. Ainda com relação ao teste de citotoxicidade, o limite máximo considerado seguro para o material ser aplicado em formulações é de 90 % de viabilidade celular, ou seja a IC10 (só mata 10% das células). Os testes utilizando-se células CHO verificaram que para as amostras HF, $HCoFS_{\gamma 2}$ e $HJCoFS_{\gamma 1}$ não foi possível determinar a IC50 para as concentrações testadas. Já para as amostras $HCoFS_{\gamma 3}$, $HCoFS_{\gamma 1}$, C_{γ} e F_{γ} tal valor foi determinado. Na Tabela 27 apresenta-se os valores referentes a IC50 e referentes a IC10 e DL50.

Tabela 30 - Valores referentes a IC50 (concentração que mata 50% das células) e referentes a IC10 (concentração que mata 10% das células) e DL50 (a concentração que mata 50 % dos animais).

Amostras	IC50 (mg/mL)	IC10 (mg/mL)	DL 50 (mg/Kg)
HCoFSγ1	0,514±0,093	0,107±0,037	1077,651357
Cγ	0,232±0,033	0,001±0,001	801,6070542
HJCoFSγ1	nd*	0,427±0,141	nd*
HCoFSγ ₃	0,145±0,337	0,017±0,018	673,0214359
HCoFSγ ₂	nd*	0,084±0,120	nd*
HF	nd*	0,010±0,014	nd*
Fγ	2,473±0,164	0,986±0,094	1933,211506
HJFeFSγ1	0,451±0,050	0,261±0,094	1026,48752
HFeFSγ ₃	1,016±2,326	0,019±0,019	1388,559389
HFeFSγ ₂	nd*	0,373±0,102	nd*
HFeFSγ1	nd*	0,010±0,018	nd*
Solvente	0,134 ±0,010	0,081±0,023	653,5562693

nd* - não determinado

Contudo, para o cálculo da DL50 para essas amostras substitui-se os valores de IC50 na seguinte equação:

 $\log LD50 (\text{mmol/kg}) = 0.439 \log IC50 (\text{mM}) + 0.621 (ICCVAM, 2006a)$ (8)

Como trata-se de compósitos (carreadores), que apresentam até quatro componentes (sistemas complexos), a viabilidade celular foi analizada em

termos de concentração em mg/mL, assim no intituito de pré-determinar a DL50 foi utilizada a equação indicada para misturas e substâncias com peso molecular desconhecido, descrita a seguir.

 $\log DL50 (mg/kg) = 0,372 \log IC50 (mg/mL) + 2,024$ (9)

Como a equação utiliza a IC50 determinada no ensaio de citotoxicidade, só foi possível pré-determinar a DL50 das amostras que efetivamente apresentaram essa informação. De qualquer forma, como a IC10, considera a concentração segura para ser adicionada a substâncias ativas, já é possível avaliar se a amostra será passível de utilização.

Na Figura 83, são evidenciadas placas com o corante neutral red, onde observa-se que, a elevação da viabilidade celular está relacionada com a baixa dispersão das amostras no meio, fato visualizado na figura 83 (E seta). Ou seja, a medida que aumentou-se a concentração das amostras em estudo, ocasionou uma diminuição na viabilidade celular como pode-se observar por meio das curvas.





(b)





· / / · · · · · ·

(e)

(C)



4.3.2 Liberação de fármaco nos híbridos e compósitos híbridos (carreadores de fármaco).

A quantidade máxima de ciprofloxacino (ciproflonax) que deverá ser liberada em cada híbrido e compósito híbrido, (carreador), está relacionada a massa usada inicialmente em cada composição, pode-se determinar a massa de fármaco que deverá ser liberada através de um balanço de massa. Para tanto, um volume de 100 mL de solução isotônica foi utilizada para dissolver 0,2 g dos híbridos e compósito híbridos (carreadores) deverão liberar uma massa de 0,0182 g de fármaco. Para um volume de 400 mL de solução isotônica e 0,8 g de compósito híbrido deverá liberar uma massa de 0,0730 g do fármaco ciproflonax.

A eficiência da conjugação do ciprofloxacino (ciproflonax) foi determinada via método indireto, direto e a massa (conteúdo) do fármaco no carreador foi determinado. O método indireto envolve a análise do fármaco intacto residual na solução (medicamento livre) determinado por meio de leituras das absorbâncias realizadas em espectrofotômetro Bel Photonics 2000 UV, na região do ultra visível no comprimento de onda máximo de 275 nm. Este comprimento foi determinado após um scanner da solução do fármaco entre 210 a 300 nm de fluorescência a 480 nm, conforme detalhado no apêndice H.

A eficiência de conjugação foi calculada utilizando a Equação (10):

Eficiência de conjugação % =
$$\frac{m \gamma \text{ (inicial)} - m \gamma \text{ (livre) } x100}{m \gamma \text{ (inicial)}}$$
 (10)

 $m\gamma$ (inicial) = massa do fármaco alimentada (inicial), usada na conjugação do híbrido e compósito híbrido

mγ (livre) = massa do fármaco total inicial – massa do fármaco liberada no sobrenadante

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada para os híbridos e compósitos híbridos conjugados com ciprofloxacino usando a Equação (11):

Eficiência de conjugação % =
$$\frac{m\gamma \text{ (conjugado)} \times 100}{m\gamma \text{ (inicial)}}$$
 (11)

A fim de evitar o efeito da presença de nanopartículas magnéticas

híbridizadas de Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ e da hidroxiapatita a quantidade de fármaco conjugado nos híbridos e compósitos híbridos foi calculado a partir da absorção da dispersão. Além disso, os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no transportador que é definido de acordo com a Equação 12:

Conteúdo de fármaco % =
$$\frac{m \gamma (\text{conjugado}) \times 100}{m \gamma (\text{total do carreador})}$$
 (12)

Os cálculos detalhados, da eficiência da conjugação do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax), de acordo com os métodos indireto, direto e o conteúdo de fármaco presente em cada híbrido e compósito híbrido no tempo máximo de liberação do fármaco se encontra no Apêndice G.

A Figura 84, esboça o perfil cinético de liberação da ciprofloxacino (ciproflonax), e na Tabela 31, são expressos o tempo de liberação máxima e a massa liberada nesse tempo dos híbridos C γ e F γ (carreadores).



Figura 84 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciproflonax adsorvido nos compósitos híbridos C γ e F γ .

O híbrido (carreador), C γ apresentou eficiência da conjugação da ciprofloxacino (ciproflonax) no tempo máximo de 110 min de 75,82% de acordo com os cálculos estabelecidos nos métodos indireto e direto que determinam a conjugação do fármaco no carreador. O conteúdo de fármaco presente no carreador por sua vez foi de 6,9 %.

O híbrido (carreador) $F\gamma$ por sua vez, apresentou uma eficiência de conjugação também no tempo de 110 min de 78,57 % de acordo com os métodos diretos e indiretos. A quantidade de ciprofloxacino (ciproflonax), no carreador é de 7,15 %. Por meio desses resultados obtidos, pode-se observar que, o carreador $F\gamma$ obtidos com as nanopartículas hibridizadas de Fe₃O₄@SiO₂ apresentou uma maior eficiência na conjugação do fármaco e o conteúdo de fármaco ciprofloxacino (ciproflonax) superior ao carreador C γ obtido com as nanopartículas hibridizadas CoFe₂O₄@SiO₂.

Tempo (min)	Massa (g) - Fγ	Massa (g) - Cγ
0	0	0
5	0,0073	0,0141
10	0,0083	0,0135
30	0,0109	0,0147
50	0,0144	0,0127
70	0,0133	0,0147
90	0,0136	0,0142
110	0,0143	0,0138

Tabela 31 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta das amostras C γ e F γ .

A eficiência de conjugação e o conteúdo (quantidade) do fármaco nos carreadores, também foram determinadas por Sadighian *et al.*, (2014) quando desenvolveram carreadores magnéticos formados por nanoparticulas de magnetita (Fe₃O₄) revestidas com o TEOS e APTES precursores da SiO₂ e conjugaram com doxorrubicina, para aplicação como carreador de fármaco anticancerígeno. E mediram a eficiência da conjugação do fármaco pelos métodos diretos e indiretos. A eficiência da conjugação (%) foi calculada indiretamente e foi de 54%, enquanto que, pelo método direto, o valor da eficiência da conjugação (%) foi de 42,4%. Essa diferença pode estar relacionada à presença de alguns medicamentos vagamente adsorvidos, que

estão sendo removidos através de etapas de lavagem ou possibilidade de degradação de fármaco através do procedimento de conjugação. O teor do fármaco (%) no carreador também foi calculado e apresentou valor em torno de 13,2%. Considerando todos os resultados, os autores concluíram que o carreador da doxorrubicina resultante é altamente promissor anticancerígeno.

Na Figura 85, pode-se observar o perfil cinético da liberação do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax), adsorvido nos compósitos. Na Tabela 29, são apresentados os valores da quantidade de fármaco expressos em gramas dessorvido nos diferentes tempos de coleta das amostras HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 .



Figura 85 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciproflonax adsorvido nos compósitos híbridos HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 .

Analisando o perfil cinético, dos compósitos híbridos e a quantidade de ciprofloxacino (ciproflonax), dessorvido no tempo máximo de 110 min conforme exposto na Tabela 32, para os compósitos híbridos HFeFS γ_1 HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 , foi possível determinar a eficiência da conjugação que, para o compósito híbrido HFeFS γ_1 foi de 64,28% e o conteúdo do fármaco presente no carreador foi de 5,85 %. Para o carreador, HFeFS γ_2 a eficiência da conjugação

foi de 59,89 % quando o conteúdo da ciprofloxacino no carreador foi de 5,45 %. O carreador HFeFS γ_3 por sua vez, no mesmo tempo de 110 min apresentou eficiência de conjugação de 95,60 % e quantidade de fármaco (ciprofloxacino) no carreador de 8,7 %.

Os valores da quantidade de fármaco expresso em gramas dessorvido nos diferentes tempos de coleta das amostras HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 encontram-se listados na Tabela 32.

Tempo (min)	Massa (g) HFeFSγ ₁	Massa (g) HFeFSγ₂	Massa (g) HFeFSγ₃
0	0	0	0
5	0,0117	0,0130	0,0062
10	0,0142	0,0137	0,0094
30	0,0144	0,0136	0,0119
50	0,0147	0,0151	0,0137
70	0,0115	0,0137	-
90	0,0156	0,0149	0,0180
110	0,0117	0,0109	0,0174

Tabela 32 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta nos compósitos híbridos HFeFS γ_1 , HFeFS γ_2 e HFeFS γ_3 .

Na Figura 86, apresenta-se o perfil cinético da liberação do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax) adsorvido e na Tabela 30, apresenta-se a massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta das amostras HCoFSγ1, HCoFSγ2, HCoFSγ3.



Figura 86 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciproflonax adsorvido nos compósitos híbridos HCoFS γ_1 , HCoFS γ_2 , HCoFS γ_3 .

Baseando-se no tempo máximo de dessorção máxima de 50 min observada na Tabela 33, e o perfil cinético da Figura 86, foi possível determinar a eficiência da conjugação da ciprofloxacino (ciproflonax) nos compósitos híbridos (carreadores). O compósito híbrido (carreador) HCoFS γ_1 apresentou 36,26 % de conjugação e uma quantidade de fármaco de 3,3 % no compósito híbrido (carreador). O compósito híbrido (carreador) HCoFS γ_2 , apresentou eficiência de conjugação de 57,14 % e quantidade de fármaco no compósito de 5,2 %. O compósito híbrido (carreador) HCoFS γ_3 , por sua vez apresentou eficiência de conjugação de 97,25 % e quantidade de fármaco no carreador de 8,85 %.

Tabela 33 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta das amostras HCoFS γ_1 , HCoFS γ_2 , HCoFS γ_3 .

Tempo (min)	Massa (g) HCoFSγ ₁	Massa (g) HCoFSγ₂	Massa (g) HCoFSγ₃
0	0	0	0
2	0,0071	0,0055	0,0160
5	0,0083	0,0054	0,0135
10	0,0078	0,0068	0,0145

15	0,0081	0,0070	0,0147
20	0,0078	0,0062	0,0182
30	0,0066	0,0069	0,0177
40	-	0,0091	-
50	-	0,0104	-

O perfil cinético da liberação do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax), reporta os valores da quantidade de fármaco expressos em gramas nos diferentes tempos de coleta das amostras dos compósitos híbridos JHFeFS γ_1 e JHCoFS γ_1 que foram obtidos com a hidroxiapatita da JHS Biomateriais (H-91) na concentração de 70:30 de HAp:NPM's@SiO₂: γ podem ser observados nas Figuras 87 e 88, e a Tabela 34.

No que se refere a eficiência de conjugação no tempo de 50 min para os compósitos híbridos (carreadores) designados por JHFeFS_{γ1} e JHCoFS_{γ1} pode-se determinar que a eficiência da conjugação da ciprofloxacino (ciproflonax) no compósito híbrido (carreador) JHFeFS_{γ1} Figura 87, apresentou eficiência de conjugação de 21,66 %, enquanto que, o conteúdo (quantidade) de fármaco no carreador foi de 1,93 %.



Figura 87 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax) no compósito híbrido JHFeFS γ_1 .

O compósito híbrido (carreador) designado por JHCoFS_{γ1} por sua vez,

cujo perfil cinético encontra-se na Figura 88, apresentou eficiência de 29,33 % e quantidade de fármaco (ciprofloxacino) no carreador de 2,669 % no tempo máximo de liberação de 50 min.



Figura 88 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciprofloxacino (ciproflonax) no compósito híbrido JHCoFS γ_1 .

is amostras JHFeFSγ1 e JHCoFSγ1.						
_	Tompo (min)	Massa (g)	Massa (g)			
	Tempo (mm)	JHFeFSγ1	JHCoFSγ1			
-	0	0	0			
	2	0,002908	0,004833			

0,003379

0,003422

0,003748

0,003425

0,003655

0,004135

0,00387

0,005201

0,005252

0,005611

0,005754

0,005825

0,005833

0,005338

5

10

15 20

30

40

50

Tabela 34 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta das amostras JHFeFS γ_1 e JHCoFS γ_1 .

Ao comparar-se os compósitos híbridos (carreadores)	HFeFS	γ ₁ e
HCoFS γ_1 obtidos com a hidroxiapatita sintetizada no LaBSma	C con	ı os
compósitos híbridos (carreadores) obtidos com a hidroxiapatit	ta da	JHS

Biomateriais (H-91), na concentração de 70:30 de HAp:NPM's@SiO₂: γ é possível observar que a eficiência da conjugação para o compósito híbrido HFeFS γ_1 foi de 42,62 % e o conteúdo do fármaco presente no carreador foi 3,92 % superiores ao compósito híbrido (carreador) JHFeFS γ_1 obtido com a hidroxiapatita da JHS biomateriais. Onde, a liberação do fármaco no carreador HFeFS γ_1 foi mais lenta (110 min) quando comparada a liberação no carreador JHFeFS γ_1 (50 min). A curva de calibração do fármaco nos compósitos híbridos, (carreadores), encontra-se apêndice G.

Em relação aos compósitos híbridos (carreadores), o compósito híbrido HCoFS_{γ1} apresentou 6,93 % de eficiência na conjugação e uma quantidade de fármaco de 0,631 % superiores ao compósito híbrido (carreador) obtido com a hidroxiapatita da JHS Biomateriais e denominado de JHCoFS_{γ1}. Onde, a liberação do fármaco no carreador HCoFS_{γ1} ocorreu de forma mais rápida (30 min) comparada a liberação no carreador JHCoFS_{γ1} (50 min).

Os compósitos híbridos HC e HF não foram submetidos a testes de liberação por não apresentarem o fármaco, sendo constituídos apenas de hidroxiapatita e NPM's hibridizadas Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂. Na Tabela 36 são evidenciados o perfil de dessorção (liberação) do antibiótico ciprofloxacino (ciproflonax) em carreadores de fármaco proposto para o tratamento da osteomielite nesta tese.

4.3.2.1 Método II - Inserção do fármaco ciproflonax (γ) no compósito híbrido HFeFS_{γ2}'

Com o objetivo de averiguar a eficiência da inserção do fármaco pelo método II, no compósito híbrido HFeFS γ_2 '. Na Figura 89, apresenta-se o perfil cinético da liberação do fármaco ciproflonax adsorvido no compósito híbrido HFeFS γ_2 ' e os valores da massa de fármaco nos diferentes tempos de coleta, encontram-se listados na Tabela 35.



Figura 89 - Perfil cinético da liberação do fármaco ciproflonax adsorvido no compósito híbrido HFeFS_{γ2}'.

Ao analisar-se o perfil cinético exposto na Figura 89, e a Tabela 35, foi possível determinar a eficiência de conjugação segundo o método de inserção Il da ciprofloxacino (ciproflonax) no compósito híbrido (carreador), designado por HFeFS_{y2}' cuja liberação ocorreu no tempo de 3000 min o que equivale a 50 horas ou cerca de 2 dias. Foi possível calcular a eficiência de conjugação do compósito híbrido HFeFS₂' pelo método direto e indireto correspondeu a 88,46 % e uma quantidade de fármaco no carreador de 8,05 %. Foi observado nos resultados anteriormente discutidos para o compósito híbrido (carreador) HFeFS_{y2} uma eficiência de conjugação de 59,89 % e a quantidade de fármaco de 5,45 %. A partir dos resultados obtidos, comparando os compósitos híbridos (carreadores) designados por HFeFS γ_2 e HFeFS γ_2 ', de acordo com os métodos I e II, na mesma composição observa-se que o método II de obtenção relativo ao compósito híbrido HFeFS₂' apresentou uma eficiência de conjugação de 28, 57 % e uma quantidade de fármaco de 2,6 % superiores a HFeFS_{y2}. Sendo portanto, altamente promissor para obtenção de compósitos híbridos (carreadores), para o tratamento da osteomielite. Na Tabela 35, é reportado os dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta do compósito HFeFS_{Y2}'.

Tabela 35 - Dados da massa de fármaco dessorvido nos diferentes tempos de coleta do compósito HFeFS γ_2 '.

Tempo (min)	Massa (g) - HFeFSγ₂
0	0
5	0,0003
25	0,0005
45	0,0009
60	0,0012
120	0,0020
180	0,0038
240	0,0034
300	0,0034
420	0,0046
540	0,0080
720	0,0069
900	0,0067
1080	0,0098
1260	0,0099
1440	0,0085
1620	0,0085
1800	0,0099
2100	0,0147
2400	0,0121
2700	0,0143
3000	0,0161

Tabela	36	-	Perfil	de	dessorção	do	antibiótico	ciprofloxacino	(ciproflonax)	nos
carreadores de fármaco usados no tratamento da osteomielite.										

Amostras	Tempo de liberação total (min)	Pico máximo da massa (g) de fármaco liberado	Tempo de pico da liberação-(min)
Ϲγ	110	0,0147	30 e 70
Fγ	110	0,0144	50
HC	nd*	nd*	nd*
HF	nd*	nd*	nd*
HJCoFSγ1	50	0,0058	40
HCoFSγ1	30	0,0083	5
HCoFSγ₂	50	0,0104	50
HCoFSγ ₃	30	0,0182	20
---------------------	------	--------	-----
HJFeFSγ₁	50	0,0041	40
HFeFSγ1	110	0,0156	90
HFeFSγ ₂	110	0,0151	50
HFeFSγ ₃	110	0,0180	90
HFeFSγ₂'	3000	0,0161	300

nd* - não determinado

A hidroxiapatita é uma biocerâmica cuja função como enxerto ósseo já vem sendo utilizada e apresenta biocompatibilidade e capacidade adsorvente possibilitando a incorporação de moléculas biologicamente ativas em sua estrutura, tais como o fármaco. Deste modo, destaca-se como potencial carreador de fármaco Kleiner *et al.,* (2014).

Os carreadores magnéticos biocompátiveis obtidos com a hidroxiapatita biologicamente ativa e as NPM's hibridizadas (core-shell) de Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ aliada as propriedades do antibiótico ciprofloxacino (ciproflonax) visa tratar a infecção liberando o antibiótico no local infectado de forma mais contínua e prolongada e a hidroxiapatita absorvida que favoreça o crescimento osteogênico e a reconstrução óssea para o preenchimento da falha criada no osso acometido pela osteomielite. Para tanto, a síntese de carreadores magnéticos serão otimizados e estudos in vivo serão desenvolvidos posteriormente como detalhado nas sugestões de trabalhos futuros.

5 CONCLUSÕES

 Foram obtidas com sucesso as nanopartículas magnéticas (NPM's) da Fe₃O₄ por reação de combustão em forno microondas e da CoFe₂O₄ por reação de combustão em escala em escala piloto; a hidroxiapatita (HAp) monofásica obtida pelo método de precipitação e híbridos NPM's@SiO₂ (*core-shell*) com características estrututurais, morfológicas e magnéticas promissoras como materiais precursores na obtenção carreadores do fármaco ciprofloxacino.

- Foram feitos ensaios de citotoxicidade para as NPM's de Fe₃O₄, CoFe₂O₄ dos híbridos Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ e da hidroxiapatita (HAp) sintetizada no LaBSmaC. Observou-se que, para todas a viabilidade celular foi superior a 70% e que, o revestimento das NPM's de Fe₃O₄, CoFe₂O₄ e obtenção dos híbridos aumentaram ainda mais a viabilidade celular e biocompatibidade das NPM's magnéticas sendo promissoras para obtenção de novos carreadores do fármaco ciprofloxacino.
- Obteve-se com sucesso os compósitos híbridos (carreadores de fármaco magnéticos) a base das NPM's híbridas e da HAp comercial da JHS Biomateriais e sintetizada no laboratório, com característica cristalina e nanoestrutural. Em que, os compósitos híbridos apresentaram propriedades estrututurais, morfológicas e magnéticas promissoras para uso como carreador de fármaco especificamente no tratamento da osteomielite.
- A biocompatibilidade dos compósitos híbridos (carreadores de fármaco) e do solvente foram avaliados, via estudos *in vitro* (citotoxidade). Observou-se por meio do perfil citótoxico que a concentração segura, na qual a viabilidade celular foi superior a 70 % foi de 0,312 mg/mL para os compósitos híbridos HFeFSγ1, HFeFSγ2, HCoFSγ1, HJCoFSγ1, Fγ, e de 0,156 mg/mL para o compósito HCoFSγ1.
- Os compósitos híbridos formados com Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ apresentaram alta eficiência na conjugação e liberação do fármaco ciprofloxacino. Entretanto, os compósitos híbridos sintetizados com a CoFe₂O₄ e a HAp comercial da JHS Biomateriais apresentaram liberação mais rápida, quando comparado aos compósito híbridos formados com a Fe₃O₄ e HAp sintetizada no laboratório. Sendo que as HAP's e NPM's eficazes para manter o antibiótico no local, favorecendo o crescimento osteogênico e a reconstrução óssea para o preenchimento da falha criada no osso acometido pela osteomielite.
- O método de inserção II do fármaco foi eficiente para a obtenção de compósitos híbridos e proporcionou uma liberação mais lenta do fármaco no compósito híbrido avaliado (HFeFSγ2) em relação aos

compósitos híbridos avaliados de acordo com o método I de inserção do fármaco, sendo esse método mais viável para obtenção de novos carreadores do antibiótico ciprofloxacino no local infectado de forma mais contínua e prolongada para o tratamento da osteomielite.

 Todas estas características permitiram auxiliar no entendimento das propriedades dos híbridos e compósitos híbridos (carreadores de fármaco) para que estes sejam otimizados com eficiência para o desenvolvimento de um produto tecnológico, eficiente para aplicação no tratamento da osteomielite.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Por meio dos resultados obtidos nesta tese, pretende-se portanto em trabalhos futuros:

 Obter carreadores a base de hidroxiapatita (HAp) e do fármaco (ciprofloxacino) para comparar aos carreadores magnéticos do fármaco ciprofloxacino obtidos nessa tese e analizar o efeito da hidroxiapatita e das NPM's como transportador (carreador) do fármaco no tratamento da osteomielite.

- Otimizar a obtenção de novos carreadores do fármaco ciprofloxacino de acordo com o método de inserção II, mantendo fixa e/ou variando-se a concentração do APTS de modo que, os novos carreadores apresentem mais sítios ativos capazes de conjugar e liberar o antibiótico no local infectado de forma mais contínua, prolongada e eficiente.
- Avaliar o estágio da osteomielite (aguda, subaguda ou crônica) e o agente etiológico da doença para avaliar a quantidade de fármaco que deve ser conjugada, liberada, o tempo de tratamento para estudo *in vivo*.
- Avaliar outros fármacos, a exemplo da vancomicina no tratamento da osteomielite.
- Realizar estudos de simulação para entender a conjugação do fármaco e como a hidroxiapatita se liga aos sítios ativos –NH₂ das NPM's hibridizadas e as ligações dos carreadores do fármaco aos osteoblastos.
- Fazer o estudo *in vitro* dos novos carreadores antes e após esterilização por raios gama e realizar estudos *in vivo*, dos carreadores magnéticos obtidos que apresentaram melhores propriedades estruturais, morfológicas, de biocompatiilidade e conjugação/liberação do fármaco ciprofloxacino no tratamento da osteomielite.

REFERÊNCIAS

AGUILAR. Z. P. Chapter 5 – Targeted Drug Delivery. Book Contents. **Nanomaterials for Medical Applications,** p.181–234, 2013.

AHMADZADEH, E.; ROWSHAN, F. T.; HOSSEINI, M. A biological method for in-situ synthesis of hydroxyapatite-coated magnetite nanoparticles using Enterobacter aerogenes: Characterization and acute toxicity assessments, **Materials Science and Engineering: C,** v. 73, p. 220-224, 2017.

ALMEIDA, M. P. S de. Síntese e caracterização de nanopartículas de maguemita recobertas com sílica funcionalizadas com grupo amina. 82f. 2008, Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química da Universidade Federal de Goias, Goiânia.

ALSHEMARY, A. Z.; AKRAM, M.; GOH, Y-F.; KADIR, M. R. A. A.; HUSSAIN, A. R. Structural characterization, optical properties and in vitro bioactivity of mesoporous erbium-doped hydroxyapatite. **Journal of Alloys and Compounds,** v.645, p. 478-486, 2015.

AMIRI, S.; SHOKROLLAHI, H. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. **Materials Science and Engineering: C,** v.33, p 1-8, 2013.

ANANTH, A.; ARTHANAREESWARAN, G.; WANG HUANTING. The influence of tetraethylorthosilicate and polyethyleneimine on the performance of polyethersulfone membranes. **Desalination**, v. 287, p. 61–70, 2012.

ANJANEYULU, U.; VIJAYALAKSHMI, U. Preparation and Characterization of Novel sol-gel derived Hydroxyapatite/Fe3O4 composites coatings on Ti-6AI-4V for biomedical applications. **Materials Letters,** Available online 25 November 2016.

ARCOS, D.; VALLET-REGI. M. Bioceramics for drug delivery. **Acta Materialia**, v.61, p. 890–911, 2013.

ASHOKAN, A.; MENON, D.; NAIR, S.; KOYAKUTTY, M. A molecular receptor targeted, hydroxyapatite nanocrystal based multi-modal contrast agent. **Biomaterials,** v. 31, p. 2606–2616, 2010.

ATACAN, K.; ÖZACAR, M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 128, p. 227-236, 2015.

AVAZPOUR, L.; KHAJEH, M. A. ZANDI.; TOROGHINEJAD, M.R.; SHOKROLLAHI, H. Synthesis of single-phase cobalt ferrite nanoparticles via a novel EDTA/EG precursor-based route and their magnetic properties. **Journal of Alloys and Compounds,** v. 637, p. 497-503, 2015.

AZEVEDO, C. B.; SOUZA, E. A. de; FARIA, E. H. de.; ROCHA.; L. A. CALEFI. P. S CIUFFI. K. J.; NASSAR. E. J. Optical properties of eu-doped hybrid materials prepared from dimethyl and methyl alkoxides precursors. **Journal of Luminescence**, v. 134, p. 551–557, 2013.

BAKUZIS, A. F.; BRANQUINHO, L. C.; CASTRO, L. L. M.; AMARAL. T. DE.; MIOTTO, E. R. Chain formation and aging process in biocompatible polydisperse ferrofluids: Experimental investigation and Monte Carlo simulations. **Advances in Colloid and Interface Science,** v.191–192, p.1–21, 2013.

BARKALINA, N.; CHARALAMBOUS, C.; JONES, CELINE.; COWARD, KEVIN. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,** 2014. BARRIOCANAL, M. B.; JIMÉNEZ, M. R.; AMADOR, J.T. R.; INSUGA, V. S.; SÁNCHEZ, A. B.; JAREÑO, M. L. L. Osteomielitis aguda: epidemiología, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamento. **Anales de Pediatría,** v. 78, p. 367-373, 2013.

BARROS, C. M. B. Estudo *in vivo* da hidroxiapatita no cimento endodôntico e seu efeito osteocondutor em ratos Wistar (*rattus norvegicus*). 172f. 2012. (Tese de Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

BARROS, C. M. B.; OLIVEIRA, S. V.; MARQUES, J. B.; COSTA, A. C. F. M.; VIANA, K. M. S. Analysis of the hydroxyapatite incorporate MTA dental application. **Materials Science Forum**, v. 727-728, p. 1381-1386, 2012.

BARUD, H. S. **Materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana.** 2010. 172f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2010.

BASTÜRK, E.; İNAN, T; GÜNGÖR, A. Flame retardant UV-curable acrylated epoxidized soybean oil based organic–inorganic hybrid coating. **Progress in Organic Coatings**, v.76, 2013, p.985-992, 2013.

BEG, M. S.; MOHAPATRA, J.; PRADHAN, LINA.; PATKAR, D.; BAHADUR, D. Porous Fe₃O₄-SiO₂ core-shell nanorods as high-performance MRI contrast agent and drug delivery vehicle. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.428, p.340-347, 2017.

BEKIARIS, G.; BRUUN, SANDER.; PELTRE, CLÉMENT.; HOUOT, SABINE.; JENSEN, S. L. FTIR–PAS: A powerful tool for characterising the chemical composition and predicting the labile C fraction of various organic waste products. **Waste Management**, v. 39, p.45-56, 2015.

BEN-ARFA, B.; MIRANDA, SALVADO I.; FERREIRA, J.; PULLAR, C. Novel route for rapid sol-gel synthesis of hydroxyapatite, avoiding ageing and using fast drying with a 50-fold to 200-fold reduction in process time. **Materials Science and Engineering: C,** v. 70, p.796-804, 2017.

BENÍCIO, B. C. M.; OLIVEIRA, S. V. de.; BENÍCIO, M. J.; SOUTO, V. K. M. de.; COSTA, A. C. F. M. Analysis of the hydroxyapatite incorporate mta dental application. **Materials Science Forum,** v. 727-728, p. 1381-1386, 2012.

BENVENUTTI, E. V.; MORO. C. C.; COSTA, TANIA M. H.; GALLAS. M. R. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Quimica Nova**, v. 32, n. 7, p.1926-1933, 2009.

BERGMANN, R-B. A Nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura,** v.60, n.2, p. 54-57, 2008.

BHAT, V.; GUPTA, H. The radiological diagnosis of infection. Orthopaedics and

Trauma, Available online 13 April 2014, ISSN 1877-1327, http://dx.doi.org/10.1016/j.mporth.2014.03.001.

BHATTACHARYA, R.; KUNDU, B.; NANDI, S. K.; BASU, D. Systematic approach to treat chronic osteomyelitis through localized drug delivery system: Bench to bed side. **Materials Science and Engineering: C,** v.33, p.3986-3993, 2013.

BHATTARAI, S. R.; REMANT, B. K.C.; ARYAL, SANTOS. H.; KHIL, M. S.; KIM. H. Y. N-Acylated chitosan stabilized iron oxide nanoparticles as a novel nanomatrix and ceramic modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 467–477, 2007.

BIASI, R. S de.; SOUZA, L. R. D. de.; FIGUEIREDO, D. G.; SILVA, C. A. B-H da. FMR lineshape of cobalt ferrite nanoparticles. **Ceramics International Part A**, v. 41, p. 865-867, 2015.

BICALHO S.M.C.; REZENDE C.F.; BORGES A.P.B ET AL. HAP-91 e Col.HAP-91 casuísticas e estudos científicos. **4ª Edição JHS Laboratório Químico Ltda.** 2008;(1):p.414.

BIGI, A.; BOANINI, E.; GAZZANO, M. Ion substitution in biological and synthetic apatites, **In Biomineralization and Biomaterials**, edited by Conrado Aparicio and Maria-Pau Ginebra, Woodhead Publishing, Boston, 2016, p. 235-266.

BIRT, M. C.; ANDERSON, D. W.; BRUCE TOBY, E.; WANG, J. Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies, **Journal of Orthopaedics**, v. 14, p. 45-52, 2017.

BOUSQUET, A.; AWADA, H.; HIORNS, R. C.; DAGRON-LARTIGAU, C. BILLON, L. Conjugated-polymer grafting on inorganic and organic substrates: A new trend in organic electronic materials. **Progress in Polymer Science**, v. 39, 11, p.1847–1877, 2014.

BROLLO, M.E.F.; OROZCO-HENAO, J.M.; LÓPEZ-RUIZ, R.; MURACA, D.; DIAS, C.S.B.; PIROTA, K.R.; KNOBEL, M. Magnetic hyperthermia in brick-like Ag@Fe₃O₄ core–shell nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 397, p. 20-27, 2016.

BROOKS, A. C.; FRANCE, L.; GAYOT, C.; LI, J. P. H.; SAULT, R.; STAFFORD, A.; WALLIS, J. D.; STOCKENHUBER, M. A designed organic–zeolite hybrid acid–base catalyst. **Journal of Catalysis**, v.285, p.10-18, 2012.

CALHOUN, J.H.; MANRING, M.M. Adult osteomyelitis. Infect. Dis. Clin. North Am. v.19, n.4, p.765-786, 2005.

CALLISTER, Jr., W. D. e RETHWISCH, D. G. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**, 8ª Edição, Rio de Janeiro: LTC, 2012.

CALTUN, O.; DUMITRU, I.; FEDER, M.; LUPU, N.; CHIRIAC, H. Substituted

cobalt ferrites for sensors applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 320, p.869-873, 2008.

CAMARGO, N. H. A.; BELLINI, O. J.; GEMELLI, E.; TOMIYAMA, M. "Synthesis and Characterization of Nanostructured Ceramics Powders for Biomedical Applications". **Revista Matéria**, 12, 574-582, 2007.

CANILLAS, M.; RIVERO, R.; GARCÍA-CARRODEGUAS, R.; BARBA, F.; RODRÍGUEZ, M. A. Processing of hydroxyapatite obtained by combustion synthesis, **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio,** Available online 30 May 2017.

CARVALHO, V. C. de.; OLIVEIRA, P. R. D. DE.; DAL-PAZ, K.; PAULA, A. P. DE.; FÉLIX, C. DA S.; LIMA, A. L. L. M. Gram-negative osteomyelitis: clinical and microbiological profile, **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.16, p.63-67, 2012.

CENDROWSKI, K.; SIKORA, P.; ZIELINSKA, B.; HORSZCZARUK, E.; MIJOWSKA, E. Chemical and thermal stability of core-shelled magnetite nanoparticles and solid silica. **Applied Surface Science**, v.407, n.15 p. 391-397, 2017.

CHAKRABORTY, R.; SENGUPTA, S.; SAHA, P.; DAS, K.; DAS, SIDDHARTHA. Synthesis of calcium hydrogen phosphate and hydroxyapatite coating on SS316 substrate through pulsed electrodeposition, **Materials Science and Engineering: C,** v. 69, p.875-883, 2016.

CHAPMAN. S.; MARINA. D. M.; KEYVAN. F. K.; ANDREW. G. A.; AMIT. J. A.; HAKHO. L. H.; THOMAS. M. T.; MARTIN. P. M.; KRZYSZTOF. P. K.; JIANGHONG. R. J.; RAVI. S. R.; SRINIVAS. S. S.; STEPHAN. S. S.; ANDREW. W. A.; JOHN. B. WEAVER. J. B.; GAYLE, W. G.; LILY. Y. L. Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise. **Nano Today,** v.8, p.454-460, 2013.

CHATTERJEE, K.; SARKAR, S.; RAO, K. J.; PARIA SANTANU. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science,** v. 209, p. 8–39, 2014.

CHEN, JIAN.; GUO, Z.; WANG, H-B.; GONG, M.; KONG, X-K.; XIA, P.; CHEN, Q-W. Multifunctional Fe₃O₄@C@Ag hybrid nanoparticles as dual modal imaging probes and near-infrared light-responsive drug delivery platform. **Biomaterials**, v.34, p.571-581, 2013a.

CHEN, C.; JIANG, X.; KANETI, Y. V.; YU, A. Design and construction of polymerized-glucose coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for delivery of aspirin. **Powder Technology**, v.236, p. 157-163, 2013b.

CHENGYUAN, Y.; YAN, Z.; JING, C. Molybdenum Oxide Supported on Hydroxyapatite-Encapsulated-Fe₂O₃: A Novel Magnetically Recyclable Catalyst for Olefin Epoxidation. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 32, p.1166-1172, 2011.

CHO, J. S.; LEE, J-C.; CHUNG, S. H.; SEO, JEONG, K.; RHEE, SANG-HOON. Effect of grain size and density of spray-pyrolyzed hydroxyapatite particles on the sinterability of hydroxyapatite disk. **Ceramics International**, v.40, p.6691-6697, 2014.

CIMOLAI. N. Chronic multifocal osteomyelitis: Is infectious causation a moot point? **Journal of Infection and Public Health,** v.4, p.157-168, 2011.

CONZ, M. B.; CAMPOS, C. N.;SERRÃO, S. D.;SOARES, G. A.;VIDIGAL JR, G. M. Physical and chemical characterizations of 12 biomaterials used as bone grafts in Implantology. **Revista implantnews**, v. 7, n.4, p.541-6, 2010.

COSTA, A. C. F. M.; KIMINAMI, R. H. G. A. Dispositivo para produção de nanomateriais cerâmicos em larga escala por reação de combustão e processo contínuo de produção dos nanomateriais. Depósito de patente. **Revista de Propriedade Industrial – RPI**, depositada em 25/01/2012, recebendo o nº BR 10 2012 002181-3.

COSTA, A.C. F. M.; FREITAS, N. L. de.; VIANA, K. M. S. In: Cerâmicas Magnéticas e suas Aplicações em Processos Químicos com Ênfase no Biodiesel. Capítulo 22, 2015, p. 519-548.

COSTA, C. A. S., SOUZA, P. P.C. Teste de Citotoxicidade em cultura de células. In: ESTRELA, C. Metodologia Científica, 2.ed. Artes Médicas, p. 213-230, 2005.

COVALIU, C. I.; JITARU, I.; PARASCHIV, G.; VASILE, E.; BIRIŞ, S.; DIAMANDESCU, L.; IONITA, V.; IOVU, H. Core–shell hybrid nanomaterials based on CoFe₂O₄ particles coated with PVP or PEG biopolymers for applications in biomedicine. **Powder Technology**, p. 415–426, 2013.

CUI, Y-R.; HONG. CHAO.; ZHOU, Y-L.; LI, Y.; GAO. X-M.; ZHANG, X-X.Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell Fe3O4 @Au magnetic nanoparticles for cell separation. **Talanta,** v. 85, p. 1246–1252, 2011.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. Introduction to magnetic materials. Addison Wesley Publishing Company, 1972.

CUNHA, M.A. Síntese e caracterização de Hidroxiapatita nanoestruturada obtidos por aspersão de solução em chama. Engenharia de Materiais, 60f, 2010. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre.

DIAZ-BENITO, B.; VELASCO, F.; MARTINEZ, F. J.; ENCINAS, N. Hydrolysis study of bis-1,2-(triethoxysilyl)ethane silane by NMR. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v.369, n. (1-3), p.53-56, 2010.

DIBENEDETTO, A. T. Tailoring of interfaces in glass fiber reinforced polymer composites: a review. **Materials Science and Engineering** A, v. 302, p. 74-82,

2001.

DINIZ, V. C. S.; DANTAS, B. B.; FIGUEIREDO, A. R.; CORNEJO, D. R.; COSTA, A.C. F. M. Avaliação microestrutural e magnética de Fe₃O₄ sintetizada pelo método de reação de combustão. **Cerâmica**, v.61, n.359, 2015.

DONESCU, D.; FIERASCU, R. C.; GHIUREA, M.; MANAILA-MAXIMEAN, D.; NICOLAE, C. A.; SOMOGHI, R.; SPATARU, C. I.; STANICA, N.; RADITOIU, V.; VASILE, E. Synthesis and magnetic properties of inverted core-shell polyaniline-ferrite composite, **Applied Surface Science**, v.414, p.8-17, 2017.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization pathological calcification and biomimetic applications. **Biomatter,** n.1, 121–164, 2011.

EARNSHAW, A. Introduction to magneto chemistry. Academic Press Inc.1968. Edition. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2009.

EDRALIN, E. J. M.; GARCIA, J. L.; ROSA, F. M. DELA.; PUNZALAN, E. R. Sonochemical synthesis, characterization and photocatalytic properties of hydroxyapatite nano-rods derived from mussel shells, **Materials Letters**, v.196, p. 33-36, 2017.

EMADI, H.; KHARAT, A. N. Synthesis and characterization of ultrafine and mesoporous structure of cobalt ferrite, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p 951-956, 2015.

ERNSTING, M. J.; MURAKAMI, MAMI.; ROY, ANIRUDDHA.; LI. SHYH-DAR. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 172, p. 782–794, 2013.

FAIRWEATHER, A.; ROBERTS, F. F.; WELCH, A. J. E. Ferrites, Reports on. **Progress in Physics,** 15, p.142, 1952.

FAJAROH, F.; SETYAWAN, HERU.; WIDIYASTUTI, W.; WINARDI, SUGENG. Synthesis of magnetite nanoparticles by surfactant-free electrochemical method in an aqueous system. **Advanced Powder Technology**, v. 23, p.328–333, 2012.

FALQUEIRO, A. M. Nanocápsulas contendo selol e fluído magnético: preparação, caracterização e avaliação da atividade antitumoral *in vitro*. (Dissertação de Mestrado), 69f, 2011. Ribeirão Preto.

FAN, C.; YAN, J.; HUANG, Y.; HAN, X.; JIANG, X. XRD and TGA-FTIR study of the effect of mineral matrix on the pyrolysis and combustion of organic matter in shale char. **Fuel**, v. 139, p. 502-510, 2015.

FARAJI, M.; YAMINI, Y.; REZAEE. M. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. **Journal of the Iranian Chemical Society.** v. 7, p. 1-37, 2010.

FARZADI, A.; BAKHSHI, F.; SOLATI-HASHJIN, M.; ASADI-EYDIVAND, M.; OSMAN, N. A. A. Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. **Ceramics International,** v. 40, p. 6021-6029, 2014.

FLENSBORG, G.; SUBY, J. A.; MARTÍNEZ, G. A case of adult osteomyelitis in a Final Late Holocene hunter-gatherer population, eastern Pampa–Patagonian transition, Argentina. **International Journal of Paleopathology,** v.3, p 128-133, 2013.

FRAIMOW H. S. Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis. **Semin Plast Surg**, v.23, p.90-9, 2009.

FRANÇA, T. C. P.; DANTAS, B. B.; VIANA, K. M. S.; SANTOS, P. T. A.; COSTA, A. C. F. M. Preparation and Characterization of Hybrid Fe₃O₄/APTES for Immobilization of GOX. **Materials Science Forum,** v. 798-799, p 460-465, 2014.

FRANKE, M. Desenvolvimento de um compósito de bisgma/tegdma e vidro de sílica dopado com prata como material de restauração dental com propriedades antibacteriana. 122f. 2009. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina.

GARIMELLA, R.; ELTORAI, A. E.M. Nanotechnology in orthopedics. **Journal of Orthopaedics**, v. 14, n. 1, p.30-33, 2017.

GASHTI, M. P.; ALMASIAN, A.; GASHTI, M. P. Preparation of electromagnetic reflective wool using nano-ZrO₂/citric acid as inorganic/organic hybrid coating. **Sensors and Actuators A: Physical,** v.187, p. 1-9, 2012.

GHEISARI, H.; KARAMIAN, E.; ABDELLAHI, M. A. novel hydroxyapatite – Hardystonite nanocomposite ceramic. **Ceramics International,** v.41, p.5967-5975, 2015.

GIL-ALBAROVA, J.; VILA, M.; BADIOLA-VARGAS, J.; SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; HERRERA, A.; VALLET-REGI, M. In vivo osteointegration of threedimensional crosslinked gelatin-coatedhydroxyapatite foams. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 3777–3783, 2012.

GNACH, A.; BEDNARKIEWICZ, A. Lanthanide-doped up-converting nanoparticles: Merits and challenges. **Nano Today,** v. 7, p 532-563, 2012.

GU, F. N.; LIN, W. G.; YANG, J. Y.; WEI, F.; WANG, Y.; ZHU, J. H. Fabrication of centimeter-sized sphere of mesoporous silica with well-defined hollow nanosphere topology and its high performance in adsorbing phenylalanine. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.151, p.142-148, 2012.

GUGLIELMO, C. DI.; LÓPEZ, D. R.; LAPUENTE, J. DE.; MALLAFRE, JOAN, M. L. SUÀREZ, M. B. Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: A first in vitro approach. **Reproductive Toxicology**, v. 30, p. 271-276, 2010.

HANNOUR, A.; VINCENT, D.; KAHLOUCHE, F.; TCHANGOULIAN, A.; NEVEU, S.; DUPUIS, V. Self-biased cobalt ferrite nanocomposites for microwave applications. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 353, p. 29-33, 2014.

HEIMANN, R. B. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. **Surface and Coatings Technology,** v. 233, p. 27–38, 2013.

HENRIQUE J.S., FALCARE R.S., LOPES P.S. Sistemas de libertação controlada. **Pharmacia Brasileira**, 2006.

HONG, R-Y.; LI, J-H.; ZHANG, S-Z.; LI, H-Z.; ZHENG, Y.; DING, J-M.; WEI, D-G. Preparation and characterization of silica-coated Fe₃O₄ nanoparticles used as precursor of ferrofluids. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 3485-3492, 2009.

HOU, C-H.; HOU, S.M.; HSUEH, Y-S.; LIN, J.; WU, H-C.; LIN, F-H. The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy. **Biomaterials,** v.30, p. 3956–3960, 2009.

http://www.jhs.med.br/ Acesso em: 02 de agosto de 2017.

HUANG, C.; TANG, Z.; ZHOU, Y.; ZHOU, X.; JIN, YONG.; LI, D.; YANG, Y.; ZHOU, S. Magnetic micelles as a potential platform for dual targeted drug delivery in cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.429, p. 113–122, 2012b.

HUANG, J-Y.; CHEN, M-H.; KUO, W-T.; SUN, Y-J.; LIN, F-H. The characterization and evaluation of cisplatin-loaded magnetite-hydroxyapatite nanoparticles (mHAp/CDDP) as dual treatment of hyperthermia and chemotherapy for lung cancer therapy. **Ceramics International**, v.41, p. 2399–2410, 2015.

HUANG, S.; LI, C.; CHENG, Z.; FAN, Y.; YANG, P.; ZHANG, C.; YANG, K.; LIN, J. Magnetic Fe₃O₄@mesoporous silica composites for drug delivery and bioadsorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.376, p.312-321, 2012a.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. "Nanoantibiotics: A new paradigm for treatinginfectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era". **Journal of Controlled Release**, v. 156, p. 128–145, 2011.

HUNEAULT, L. M.; LUSSIER, B.; DUBREUIL, P.; CHOUINARD, L.; DÉSÉVAUX, C. Prevention and treatment of experimental osteomyelitis in dogs with ciprofloxacin-loaded crosslinked high amylose starch implants. **Journal of**

Orthopaedic Research, v. 22, p. 1351-1357, 2004.

HWANG, H-J.; JEONG, W-K.; LEE, D-H.; LEE, S-H. Acute Primary Hematogenous Osteomyelitis in the Epiphysis of the Distal Tibia: A Case Report WITH. Review of the Literature, **The Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 55, 2017.

ISO 10993-12 - Biological Evaluation of Medical Devices – part 12: Sample preparation and reference materials.

ISO 10993-5 - Biological Evaluation of Medical Devices – part 5 - Tests for in vitro cytotoxicity.

ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.

JAIN, K.; MEHRA, N. K.; JAIN, N. K. Potentials and emerging trends innanopharmacology. **Current Opinion in Pharmacology,** v. 15, p. 97–106, 2014.

JAIN, S. R.; ADIGA, K. C.; PAI VERNEKER, V. A new approach to thermo chemical calculations of condensed fuel-oxidizer mixture Combustion. **Flame**, v. 40, p. 71-79, 1981.

JAIN, V.; SINGH, V.; MISHRA, A. Acute osteomyelitis associated with Deep vein thrombosis in a patient of acute abdomen: A diagnostic dilemma, **Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma**, v.3, p.112-114, 2012.

JAYAKRISHNAN, P.; RAMESAN, M.T. Studies on the effect of magnetite nanoparticles on magnetic, mechanical, thermal, temperature dependent electrical resistivity and DC conductivity modeling of poly (vinyl alcohol-co-acrylic acid)/Fe₃O₄ nanocomposites, **Materials Chemistry and Physics**, v. 186, p. 513-522, 2017.

JIANG, H.; LIU. J-K.; WANG. J-D.; LU. YI.; ZHANG. MIN.; YANG. X-H.; HONG. DAN-JING. The biotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles to the plant growth. **Journal of Hazardous Materials,** v. 270, p.71–81, 2014.

JINXIA. AN.; ZHANG, X.; GUO, Q.; ZHAO, Y.; WU, Z.; LI, C. Glycopolymer modified magnetic mesoporous silica nanoparticles for MR imaging and targeted drug delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 482, p. 98-108, 2015.

JOSE, M. N.; PRADO, L. A. S. A. de. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n.2, p.281-288, 2005.

JOSHI, S.; RAO, A. LEHMLER, H-J.; BARBARA L. KNUTSON, STEPHEN E. RANKIN, Interfacial molecular imprinting of Stöber particle surfaces: A simple approach to targeted saccharide adsorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.428, p.101-110, 2014.

JUNIOR, M. Â. S. Obtenção e caracterização de nanopartículas magnéticas

inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro. 162 f. 2009. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

KAI-HUI; Z.; YU-PING, Z.; DONGLIANG, J. Synthesis and Magnetic Property of Iron Ions-Doped Hydroxyapatite. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology,** v. 12, n. 9, p.7096-7100 (5), 2012.

KANCHANA, P.; LAVANYA, N.; SEKAR. C. Development of amperometric Ltyrosine sensor based on Fe-doped hydroxyapatite nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C,** v. 35, p. 85-91, 2014.

KANGO, S.; KALIA, S.; CELLI, A.; NJUGUNAD, J.; HABIBI, Y.; KUMAR. RAJESH. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites-A review. **Progress in Polymer Science**, v.38, p. 1232–126, 2013.

KANIMOZHI, S.; PERINBAM, K. Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and its application in immobilization of lipase from Pseudomonas fluorescens Lp1. **Materials Research Bulletin**, v. 48, p. 1830–1836, 2013.

KARATAS, S.; HOSGÖR, Z.; KAYAMAN-APOHAN, N.; GÜNGÖR, A. Preparation and characterization of phosphine oxide containing organosilica hybrid coatings by photopolymerization and sol–gel process, **Progress in Organic Coatings**, v.65, p.49-55, 2009.

KEMPE, H e KEMPE, M The use of magnetite nanoparticles for implantassisted magnetic drug targeting in thrombolytic therapy. **Biomaterials**, v. 31, 9499-9510, 2010.

KHAN, J. A.; QASIM, M.; SINGH, B. R.; KHAN, W.; DAS, D.; H. A.; NAQVI, Polyaniline/CoFe₂O₄ nanocomposite inhibits the growth of Candida albicans 077 by ROS production. **Comptes Rendus Chimie,** v. 17, p. 91-102, 2014.

KHANDEKAR, M. S.; KAMBALE, R. C.; PATIL, J. Y.; KOLEKAR, Y. D.; SURYAVANSHI, S. S. Effect of calcination temperature on the structural and electrical properties of cobalt ferrite synthesized by combustion method. **Journal of Alloys and Compounds,** v. 509, p.1861–1865, 2011.

KLEINER, L. W.; WRIGHT, J. C.; WANG, Y. Evolution of implantable and insertable drug delivery systems. **Journal of Controlled Release.** v. 181, p.1-10, 2014.

KIM, D-H.; NIKLES, D. E.; JOHNSON, D. T.; BRAZEL, C. S. Heat generation of aqueously dispersed CoFe₂O₄ nanoparticles as heating agents for magnetically activated drug delivery and hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, p. 2390-2396, 2008.

KIM, J.; PECK, K. KIM, R. E-S.; CHO, S. Y.; HA, Y. E.; KANG, C-I.; DOO, CHUNG, D. R.; SONG,J-H. S. Outcome of culture-negative pyogenic vertebral osteomyelitis: Comparison with Microbiologically Confirmed Pyogenic Vertebral Osteomyelitis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism, Available online**, 2014.

KIM, P. S.; DJAZAYERI, S.; ZEINELDIN, R. Novel nanotechnology approaches to diagnosis and therapy of ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 120, p. 393-403, 2011.

KNOBEL, M.; NUNES, W. C.; SOCOLOVSKY, L. M.; BIASI, E. D.; VARGAS, J. M.; DENARDIN, J. C. Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: a review on ideal and real systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p.2836-2857, 2008.

KOMARNENI, S.; HU, W.; NOH, Y. D.; ORDEN, A. V. FENG, S.; WEI, C.; PANG. H.; GAO, F.; LU. Q.; KATSUKI, H. Magnetite syntheses from room temperature to 150 °C with and without microwaves. **Ceramics International**, v. 38, p. 2563–2568, 2012.

KOORBUSCH, G. F.; DEATHERAGE, J. R.; CURÉ, J. K. How Can We Diagnose and Treat Osteomyelitis of the Jaws as Early as Possible?. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v.23, p.557-567, 2011.

KOOTI, M.; AFSHARI, M. Phosphotungstic acid supported on magnetic nanoparticles as an efficient reusable catalyst for epoxidation of alkenes. **Materials Research Bulletin**, v. 47, 3473–3478, 2012.

KOOTI, M.; GHARINEH, S.; MEHRKHAH, M.; SHAKER, A.; MOTAMEDI, H. Preparation and antibacterial activity of CoFe₂O₄/SiO₂/Ag composite impregnated with streptomycin. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 34-42, 2015.

KUAN, HSU-CHIANG.; MA, C-C. M, WANG, F-Y.; KUAN, HSU-CHIANG. Thermo-oxidative degradation of novel epoxycontaining silicon and phosphorous nanocomposites. **European Polymer Journal**, v. 39, p. 825–830, 2003.

KÜCKELHAUS, S.; REIS, S.C.; CARNEIRO, M. F.; TEDESCO, A.C.; OLIVEIRA, D.M.; LIMA, E.C.D.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B.; LACAVA, Z.G.M. In vivo investigation of cobalt ferrite-based magnetic fluid and magneto liposomes using morphological tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272–276, p. 2402-2403, Part 3, 2004.

KUDA, O.; PINCHUK, N.; IVANCHENKO, L.; PARKHOMEY, O.; SYCH, O.; LEONOWICZ, M.; WROBLEWSKI, R.; SOWKA, E. Effect of Fe₃O₄, Fe and Cu doping on magnetic properties and behaviour in physiological solution of biological hydroxyapatite/glass composites. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 209, p. 1960-1964, 2009.

KUMAR, K. S.; SEENUVASAN, M.; MALAR, C. G.; PREETHI, S.; BALAJI, N.;

IYYAPPAN, J.; KUMAR, M. A. Fabrication, characterization and application of pectin degrading Fe₃O₄–SiO₂ nanobiocatalyst. **Materials Science and Engineering C**, 2013.

KUMAR, P.; GULIANTS, V. V. Periodic mesoporous organic–inorganic hybrid materials: Applications in membrane separations and adsorption. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.132, p.1-14, 2010.

KUMARI, S.; SINGH, R P. Glycolic acid functionalized chitosan–Au–Fe₃O₄ hybrid nanoparticle base nanohybrid scaffold for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 244– 249, 2013.

LADJ. R.; BITAR. A.; MOHAMED M. HATEM. E.; MUGNIER. F.; Y.; DANTEC. R. L; ELAISSARI. A. Polymer Encapsulation of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Applications. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 458, p.230-41. 2013.

LEE, K-J.; AN, J-H.; SHIN, J-S.; KIM, D-H.; YOO, H-S.; CHO, C-K.; Biostability of γ -Fe₂O₃ nano particles Evaluated using an in vitro cytotoxicity assays on various tumor cell lines. **Current Applied Physics**, v.11, p. 467-471, 2011.

LEE, W-S.; CHEN, Y-C.; CHEN, H-P.; CHEN, T-H.; CHENG, C-Y. Vertebral osteomyelitis caused by vancomycin-tolerant methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia: Experience with teicoplanin plus fosfomycin combination therapy. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection,** Available online, 21 November 2013.

Li, T-J.; Huang, C-C.; Ruan, P-W.; Chuang, K-Y.; Huang, K-J.; Shieh, D-B.; Yeh, C-S. In vivo anti-cancer efficacy of magnetite nanocrystal - based system using locoregional hyperthermia combined with 5-fluorouracil chemotherapy, **Biomaterials**, v.34, p.7873-7883, 2013.

LI, Y.; JIN, Z.; LI. T.; XIU. Z. One-step synthesis and characterization of coreshell Fe@SiO₂ nanocomposite for Cr (VI) reduction. **Science of the Total Environment,** v. 421-422, p. 260–266, 2012.

LIMA, A. L. L.; OLIVEIRA, P. R.; CARVALHO, V. C.; CIMERMAN, S. SAVIO, E. on behalf of the Diretrizes Panamericanas para el Tratamiento de las Osteomielitis e Infecciones de Tejidos Blandos Group, Recommendations for the treatment of osteomyelitis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases,** Available online 1 April 2014, ISSN 1413-8670, http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.12.005.

LIMA, M. G. de. **Avaliação** *in vitro* e *in vivo* do compósito Al₂O₃/CaPs para uso na cirurgia bucomaxilofacial. 137 f. 2013. (Tese de Doutorado) - Centro de Ciências e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais-Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

LIMAYE, M. V.; SINGH, S. B.; DAS, R.; PODDAR, P.; KULKARNI, SULABHAK. Room temperature ferro magnetism in undoped and Fe doped ZnO nanorods: Microwave-assisted synthesis. Journal of Solid State Chemistry, v.184, p. 391–400, 2011.

LIN, J.; CHEN, H.; FEI, T.; LIU, C.; ZHANG, JINLONG. Highly transparent and thermally stable superhydrophobic coatings from the deposition of silica aerogels. **Applied Surface Science**, v. 273, p. 776–786, 2013.

LIU, G.; WANG, Z.Y.; LU, J.; XIA, C.C.; GAO, F. B.; GONG, Q.Y.; SONG, B.; ZHAO, X.N.; SHUAI, X.T. Chen, X.Y.; Ai, H.; Gu, Z.W. Low molecular weight alkyl-polycation wrapped magnetite nanoparticle clusters as MRI probes for stem cell labeling and in vivo imaging. **Biomaterials**, v.32 p. 528–537, 2011.

LIU, Y.; WANG, J.; YIN, Q. The crystal habit of ciprofloxacin hydrochloride monohydrate crystal. **Journal of Crystal Growth**, p.276 237–242, 2005.

LIU, Z.; WANG, Q.; YAO, S.; YANG, L.; YU, S.; FENG, X. LI, F. Synthesis and characterization of Tb³⁺/Gd³⁺ dual-doped multifunctional hydroxyapatite nanoparticles. **Ceramics International**, v.40, p.2613-2617, 2014.

LONG, J.; YU, X.; XU, E.; WU, Z.; XU, X.; JIN, Z.; JIAO, A. In situ synthesis of new magnetite chitosan/carrageenan nanocomposites by electrostatic interactions for protein delivery applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 98-107, 2015.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova,** v. 27, p. 670-673, 2004.

LU, W.; SHEN, Y.; XIE, A.; ZHANG, W. Preparation and drug-loading properties of Fe₃O₄/Poly (styrene-co-acrylic acid) magnetic polymer nanocomposites. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 345, p.142-146, 2013.

LUNG, C. Y. K.; MATINLINNA, J. P. Aspects of silane coupling agents and surface conditioning in dentistry: An overview. **Dental Materials**, v. 28, p. 467–477, 2012.

MAIA, M.; KLEIN, E. S.; MONJE, T. V.; PAGLIOSA, C. Facial structure reconstruction by biomaterials: literature review. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.25, n.3, 2010.

MAJEED, J.; PRADHAN, LINA.; NINGTHOUJAM, R. S.; VATSA, R.K.; BAHADUR, D.; TYAGI, A. K. Enhanced specific absorption rate in silanol functionalized Fe_3O_4 core-shell nanoparticles: Study of Fe leaching in Fe_3O_4 and hyperthermia in L929 and HeLa cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.122, p. 396-403, 2014.

MALEKI, A.; ALREZVANI, Z.; MALEKI, S. Design, preparation and characterization of urea-functionalized Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanocatalyst and application for the one-pot multicomponent synthesis of substituted imidazole derivatives. **Catalysis Communications**, v. 69, p.29-33, 2015.

MAO, X.; HU, B.; HE, M.; CHEN, B. High polar organic–inorganic hybrid coating stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of seleno-amino acids and seleno-oligopeptides in biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1256 p.32–39, 2012.

MARUI, T.; YAMAMOTO, T.; AKISUE, T.; NAKATANI, T.; HITORA, T.; NAGIRA, K.; YOSHIYA, S.; KUROSAKA, M. Subacute osteomyelitis of long bones: Diagnostic usefulness of the "penumbra sign" on MRI. **Clinical Imaging**, v.26, p. 314-318, 2002.

MATERNE, F. DE BUYL, G. WITTUCKI.Nanoparticles: Implication for cellular labeling and magnetic resonance Organosilane Technology in Coating Applications: Review and Perspectives. In: 9th Congresso Internacional de Tintas – ABRAFATI, São Paulo, 2005.

MAURICIO, M. R.; BARROS, H. R. de.; GUILHERME, M. R.; RADOVANOVIC, E.; RUBIRA, A. F. CARVALHO, G. M. de. Synthesis of highly hydrophilic magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ for potential use in biologic systems, Colloids and Surfaces A: **Physicochemical and Engineering Aspects**, v.417, p.224-229, 2013.

MCNALLY, M.; NAGARAJAH, K. OSTEOMYELITIS. **Orthopaedics and Trauma,** v.24, p.416-429, 2010, ISSN 1877-1327. http://dx.doi.org/10.1016/j.mporth.2010.09.004.

MEDVECKY, L.; SOPCAK, T.; GIRMAN, V.; BRIANCIN, J. Amorphous calcium phosphates Synthesized by precipitation from calcium D –gluconate Solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 417, p. 191–200, 2013.

MEHTA, D.; MONDAL, P.; SAHARAN, V. K.; GEORGE, S. Synthesis of hydroxyapatite nanorods for application in water defluoridation and optimization of process variables: Advantage of ultrasonication with precipitation method over conventional method, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 56-70, 2017.

MESSORI, M.; FABBRI, P.; PILATI, F.; TONELLI, C.; TOSELLI, M. Perfluoropolyether-based organic–inorganic coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 72, p. 461–468, 2011.

MICULESCU, F.; MOCANU, A-C.; DASCĂLU, C. A.; MAIDANIUC, A.; BATALU, D.; BERBECARU, A.; VOICU, S. I.; MICULESCU, M.; THAKUR, V. K.; CIOCAN, L. T. Facile synthesis and characterization of hydroxyapatite particles for high value nanocomposites and biomaterials, **Vacuum**, Available online 7 June 2017.

MOREL, M.; MARTÍNEZ, F.; MOSQUERA, E. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles from mineral magnetite. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 343, p. 76–81, 2013.

MPALARIS. V.; ARSOS. G.; IAKOVOU. I.; DALPA. E.; KARATZAS. N.

Discordance between MRI and bone scan findings in a child with acute complicated osteomyelitis: Scintigraphic features that contribute to the early diagnosis. **Rev Esp Med Nucl Imagen**, v. 33, p.106–108, 2014.

MURUGAN, C.; SUBRAMANIAN, E.; PADIYAN, D. P. p–n Heterojunction formation in polyaniline–SnO₂ organic–inorganic hybrid composite materials leading to enhancement in sensor functionality toward benzene and toluene vapors at room temperature. **Synthetic Metals**, v.192, p.106-112, 2014.

NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; EDALAT, F.; RAYMOND, K.; KHADEMHOSSEINI. A.; CHEN P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal** of Controlled Release, v. 166, p. 182–194, 2013.

NADEEM, K.; KRENN, H.; SARWAR, W.; MUMTAZ, M. Comparison of surface effects in SiO₂ coated and uncoated nickel ferrite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 288, p. 677–681, 2014.

NADEEM. M.; NADEEM. S.; KHAWAJA T.M. Drug Therapy in Osteomyelitis. International Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 2, p. 67-75, 2010.

NANDI, S. K.; BANDYOPADHYAY, S.; DAS, P.; SAMANTA, I.; MUKHERJEE, P.; ROY, S.; KUNDU, B. Understanding osteomyelitis and its treatment through local drug delivery system, **Biotechnology Advances** v.34, p. 1305–1317, 2016.

NGADIMAN, N. H. A.; IDRIS, A.; IRFAN, MUHAMMAD.; KURNIAWAN, D.; YUSOF, N. M.; NASIRI, R. γ-Fe₂O₃ nanoparticles filled polyvinyl alcohol as potential biomaterial for tissue engineering scaffold. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 49, p. 90-104, 2015.

NOELIA L.; D'ELÍA, A.; GRAVINA, N.; RUSO, J. M.; LAIUPPA, J. A. SANTILLÁN, G. E. MESSINA, P. V. Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects,** v.1830, p. 5014-5026, 2013.

O'HANDLEY, R. C. **Modern Magnetic Materials-Principles and Applications.** Ed. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, INC., New York, p. 129-130, 1942.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals 432: In vitro e 3T3 NRU phototoxicity test, abr. 2004.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance monitoring, n.1, jan. 1998.

OECD. 2010. Test No. 129. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. ENV/JM/MONO

(2010).

OECD. 2014. Test No. 194: OECD Guidance on Grouping of Chemicals, Second Edition. Series on Testing & Assessment. ENV/JM/MONO.

OGAWA, C. A.; PLEPIS, A. M. DE G. Estudos preliminares de liberação de ciprofloxacino em compósito hidroxiapatita: colágeno. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica,** v. 17, p. 123-130, 2001.

OZYILMAZ, E.; SAYIN, SERKAN.; ARSLAN, M.; YILMAZ, M. Improving catalytic hydrolysis reaction efficiency of sol–gel-encapsulated Candida rugosa lipase with magnetic _-cyclodextrin nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v.113, p. 182–189, 2014.

PADILHA, A. F. Materiais de Engenharia Microestrutura e Propriedades. 2000.

PANSERI, S.; CUNHA, C.; D'ALESSANDRO. T.; SANDRI. M.; Giavaresi, G.; Marcacci, M.; Hung, C. T.; Tampieri. A. Intrinsically superparamagnetic Fehydroxyapatite nanoparticles positively influence osteoblast-like cell behaviour **Journal of Nanobiotechnology**, 10:32, 2012a.

PANSERI, S.; CUNHA, C.; D'ALESSANDRO, T.; SANDRI, M.; RUSSO, A.; GIANLUCA, G.; MARCACCI, M.; HUNG, C. T.; TAMPIERI. A. Magnetic Hydroxyapatite Bone Substitutes to Enhance Tissue Regeneration: Evaluation *In Vitro* Using Osteoblast-Like Cells and *In Vivo* in a Bone Defect. **PLoS ONE**, v. 7, n.6, 2012b.

PARK, K-H.; CHO, O. H.; JUNG, M.; SUK, K-S.; LEE, J. H.; PARK, J. S.; NAM. K.; R.; KIM, S-H.; LEE, S-O.; CHOI, S-H.; BAE, I-G.; KIM, Y. S.; WOO, J. H.; LEE, M. S. Clinical characteristics and outcomes of hematogenous vertebral osteomyelitis caused by gram-negative bacteria. **Journal of Infection**, Available online, 20 February 2014.

PERSHINA, A. G.; SAZONOV, A. E.; OGORODOVA, L. M. Investigation of the interaction between DNA and cobalt ferrite nanoparticles by FTIR spectroscopy. Russian. **Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, p. 607-613, 2009.

PESSOA, R. C. 2009. Estudo das características magnéticas e absorvedoras das ferritas de NiZn, NiZnMn, MnZn, NiMg, NiCuZn e NiCuZnMg obtidas via método do citrato precursor. Tese (Doutorado em Química) – UFRN, Natal.

PHOTOTOX®. Statistical Software Phototox® Version 2.0 for OECD TestGuideline432.<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/33968900.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2016.

PINEDA, C.; VARGAS, A.; RODRÍGUEZ, A. V. Imaging of Osteomyelitis: Current Concepts. Infectious Disease Clinics of North America, v. 20, p.789-825, 2006.

PINGARRÓN, J. M.; DÍEZ, P.; VILLALONGA, R.; VILLALONGA, M. L. Supramolecular immobilization of redox enzymes on cyclodextrin-coated magnetic nanoparticles for biosensing applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 386, p.181-188, 2012.

PLANK, C.; ZELPHATI, O.; MYKHAYLYK, O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection—Progress and prospects. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v.63, p. 1300–1331, 2011.

PON-ON, W.; CHAROENPHANDHU, N.; TANG, I-M.; JONGWATTANAPISAN, P.; KRISHNAMRA, N.; HOONSAWATF, R. Encapsulation of magnetic CoFe₂O₄ in SiO₂ nanocomposites using hydroxyapatite as templates: A drug delivery system. **Materials Chemistry and Physics**, v. 131, p. 485–494, 2011.

PRODANA, M.; DUTA, M.; IONITA, D.; BOJIN, D.; STAN, M.S.; DINISCHIOTU, A.; DEMETRESCU, I. A new complex ceramic coating with carbon nanotubes, hydroxyapatite and TiO₂ nanotubes on Ti surface for biomedical applications. **Ceramics International Part A**, v. 41, p. 6318-6325, 2015.

PRODĚLALOVÁ, J.; RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A.; PETROVÁ, K.; BENEŠ, M. J. Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles, **Journal of Chromatography A,** v. 1056, p. 43-48, 2004.

RANE, D. S.; SHARMA, MAN M. New strategies for the Hofmann reaction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 59, n.3, p. 271–277, 1994.

RAMCHANDANI, M.; ROBINSON, D. In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. **Journal of Controlled Release**, v. 54, p 167–175, 1998.

RAMESH, T.; SHINDE, R.S.; MURTHY, S.R. Synthesis and characterization of nanocrystalline Ni_{0.94}Co_{0.03}Mn_{0.04}Cu_{0.03}Fe_{1.96}-xAl_xO₄ ferrites for microwave device applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 345, p. 276-281, 2013.

RAO, K. N.; SINGH, A.; PRAKASH, G. V. Synthesis, structure and optical studies of inorganic–organic hybrid semiconductor, (H₃NC₆H₄CH₂NH₃) PbI₄. **Materials Research Bulletin**, v.52, p.78-81, 2014.

REED, J. S. **Principles of ceramics processing.** New York: John Wiley & Sons, 1996.

REY C.; COMBES, C. 3 - Physical chemistry of biological apatites, In Biomineralization and Biomaterials, edited by Conrado Aparicio and Maria-Pau Ginebra, Woodhead Publishing, **Boston**, p. 95-127, 2016.

REZENDE, S. M. **A física de materiais e dispositivos eletrônicos**. Recife: Editora da Universidade Federal de Pernambuco, 1996.

RIGO, E. C. S. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Rev. Dental Press Periodontia Implantol. Maringá,** v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

ROY, M.; SOMERSON. J. S.; KERR. K. G.; CONROY. L. **Pathophysiology and Pathogenesis of Osteomyelitis, Osteomyelitis,** 2012. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0399-8, Prof. Mauricio S. Baptista (Ed.), ISBN: 978-953-51-0399-8.

RYU, J. H.; HONG, S.; LEE, HAESHIN. Bio-inspired Adhesive Catecholconjugated Chitosan for Biomedical Applications: A Mini Review. **Acta Biomaterialia**, Available online 28 August 2015.

SADIGHIAN, S.; ROSTAMIZADEH. K.; HOSSEINI-MONFARED. H.; HAMIDI. M. Doxorubicin-conjugated core–shell magnetite nanoparticles as dual-targeting carriers for anticancer drug delivery, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v.117, p.406–413, 2014.

SAERI, M. R.; AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SORRELL, C. C. The wet precipitation process of hydroxyapatitell. **Materials Letters**, 57, 4064–4069, 2003.

SAFARI, J.; JAVADIAN, L. Ultrasound assisted the green synthesis of 2-amino-4H-chromene derivatives catalyzed by Fe₃O₄-functionalized nanoparticles with chitosan as a novel and reusable magnetic catalyst. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 341-348, 2015.

SAMAVATI, A.; ISMAIL, A. F. Antibacterial properties of copper-substituted cobalt ferrite nanoparticles synthesized by co-precipitation method, **Particuology**, v 30, p. 158-163, 2017.

SANTOS, P. T. A. dos. "Obtenção de híbridos de nanoferrita/SiO₂/quitosana para uso em biossensores". Tese de Doutorado,113f. 2015. Campina Grande, 2015.

SANTOS, R. L. P. **"Avaliação dos combustíveis ureia e glicina na síntese por reação de combustão de ferrita Mn**_{0,65}**Zn**_{0,35}**Fe**₂**O**₄**."** Dissertação de Mestrado, Campina Grande, 2015.

SATTARAHMADY, N.; ZARE, T.; MEHDIZADEH, A.R.; AZARPIRA, N.; HEIDARI, M.; LOTFI, M.; HELI, H. Dextrin-coated zinc substituted cobalt-ferrite nanoparticles as an MRI contrast agent: *In vitro* and *in vivo* imaging studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 129, p.15-20, 2015.

SCHMIDT, E. R.; TOWNSEND, J. Unusual Complication of Subacute Osteomyelitis Following Tibial Bone Graft: Report of a Case. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery,** v. 66, p.1290-1293, 2008.

SCHERRER, P. Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgensrahlen [Determination of the size and internal structure of colloidal particles using X-rays]. Nachr Ges Wiss Goettingen, Math-Phys Kl. 1918:98-100. German.

SCHMITT, S. K. Osteomyelitis, **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 31, p. 325-338, 2017.

SCHOEN, R.; SUAREZ-CUNQUEIRO, M. M.; METZGER, M.C.; SCHMELZEISEN, R. "Osteomyelitis of the mandible following third molar surgery: a regrettable consequence in a healthy patient". **Quintessence**, Editora LTDA, v. 40, p. 351-354, 2009.

SHAHROUSVAND, M.; HOSEINIAN, M. S.; GHOLLASI, M.; KARBALAEIMAHDI, A.; SALIMI, A.; TABAR, F. A. Flexible magnetic polyurethane/Fe₂O₃ nanoparticles as organic-inorganic nanocomposites for biomedical applications: Properties and cell behavior. **Materials Science and Engineering: C**, v.74, p.556-567, 2017.

SHAN, Z.; LI, X.; GAO, Y.; WANG, X.; LI, C.; WU, Q. Application of magnetic hydroxyapatite nanoparticles for solid phase extraction of plasmid DNA. **Analytical Biochemistry,** v. 425, p.125-127, 2012.

SHANEHSAZ, M.; SEIDI, S.; GHORBANI, Y.; SHOJA, S. M. R. S. R. Polypyrrole-coated magnetic nanoparticles as an efficient adsorbent for RB19 synthetic textile dye: Removal and kinetic study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,** v.149, p. 481-486, 2015.

SHARMA, R.; PANDEY, R. R.; GUPTA, A. A.; KAR, S.; DHAYAL, M. In situ amino acid functionalization and microstructure formation of hydroxyapatite nanoparticles synthesized at different pH by precipitation route. **Materials Chemistry and Physics**, v.133, p. 718–725, 2012.

SHARMIN, N.; KHAN, R. A.; DUSSAULT, D. S.; STEPHANE, AKTER, NOUSIN.; LACROIX, M. Effectiveness of silane monomer and gamma radiation on chitosan films and PCL-based composites. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p 932–935, 2012.

SHEKAR, S.; SMITH. A. J.; WILLIAM J. KRAFT, M. M.; WAGNER. W. On a multivariate population balance model to describe the structure and composition of silica nanoparticles. **Computers & Chemical Engineering,** v. 43, p. 130–147, 2012.

SHEYKHAN, M.; MANI, L. M.; EBRAHIMI, A.; HEYDARI, A. Sulfamic acid heterogenized on hydroxyapatite-encapsulated-Fe₂O₃nanoparticles as a magnetic green interphase catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A:** Chemical, v. 335, p. 253–261, 2011.

SHI, L.; WANG, L.; ZHANG, T.; LI, J.; HUANG, X.; CAI, J.; LÜ, J.; WANG, Y. Reducing the bioavailability and leaching potential of lead in contaminated water hyacinth biomass by phosphate-assisted pyrolysis, **Bioresource Technology**, Available online 8 June 2017.

SHUNDO, C.; ZHANG, H.; NAKANISHI, T.; OSAKA,T. Cytotoxicity evaluation of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in mouse embryonic stem cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 221–225, 2012.

SILVA-JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V. K.; PESTANA, C.; MERCURI, L. P.; MATOS, JIVALDO R. de.; OLIVEIRA, A. G. de Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. **Thermochimica Acta**, v.467, p. 91-98, 2008.

SINGH, JAY.; SRIVASTAVA, MANISH.; KALITA, PRASANTA.; MALHOTRA, B. D. A novel ternary NiFe₂O₄/CuO/FeO-chitosan nanocomposite as a cholesterol biosensor. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2189-2198, 2012.

SINNECKER, J. P. Materiais Magnéticos Doces e Materiais Ferromagnéticos Amorfos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, p. 396 – 405, 2000.

SLAVOV, L.; ABRASHEV, M.V.; MERODIISKA, T.; GELEV, CH.; VANDENBERGHE, R.E.; MARKOVA-DENEVA, I.; NEDKOV, I. Raman spectroscopy investigation of magnetite nanoparticles in ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 322, p.1904-1911, 2010.

SMITH, W. R.; SHANK, J. R. Surgical treatment of osteomyelitis.**Operative Techniques in Orthopaedics,** v.12, p.258-272, 2002.

SOUZA, K. C. de.; MOHALLEM, N. D. S.; SOUSA, E. M. BARROS De. Nanocompósitos magnéticos: potencialidades de aplicações em biomedicina. **Quimica Nova,** v. 34, n. 10, p.1692-1703, 2011.

STÖBER, W.; FINK, A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 26, p.62-69, 1968.

SUEI, Y.; TAGUCHI, A.; TANIMOTO, K. "Diagnosis and classification of mandibular osteomyelitis". Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, **Oral Radiology, and Endodontology,** v. 100, p. 207-214, 2005.

SUNDAR, S.; MARIAPPAN, R.; PIRAMAN, S. Synthesis and characterization of amine modified magnetite nanoparticles as carriers of curcumin-anticancer drug. **Powder Technology,** v. 266, p.321-328, 2014.

SZCZEŚ, A.; HOŁYSZ, L.; CHIBOWSKI, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications, **Advances in Colloid and Interface Science**, Available online 20 April 2017.

TA, T. K. H.; TRINH, M-T.; LONG, N. V.; NGUYEN, T. T. M. T. L.; NGUYEN, T.; THUOC, T. L.; PHAN, B. T. D. M.; MAENOSONO, S. TRAN-VAN, H.; LE, V. H. Synthesis and surface functionalization of Fe₃O₄-SiO₂ core-shell nanoparticles with 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane and 1,1'-carbonyldiimidazole for bio-applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 504, p. 376-383, 2016.

TAFIN-KAMPÉ, K.; KAMSU-FOGUEM, B. Acute osteomyelitis due to Staphylococcus aureus in children: What is the status of treatment today?. **Pediatric Infectious Disease,** v.5, p.122-126, 2013.

TAN, F.; NACIRI, M.; DOWLING, D.; AL –RUBEAI, MOHAME. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of CoBlast hydroxyapatite coating and the effect of impaction on its osteoconductivity. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 352–362, 2012.

TANG, C. M.; HOOD. DEREK W.; MOXON, E. R. in: Chapter 14 - Pathogenesis of Haemophilus influenzae Infections, In Principles of Bacterial Pathogenesis, edited by Eduardo A. Groisman. **Academic Press, San Diego,** p. 675-716, 2001.

TANG, Y.; WANG, X.; ZHANG, Q.; LI, Y.; WANG, H. Fabrication and characterization of high solid content Co_{0.8}Ni_{0.2}Fe₂O₄/PVP composite nanofibers by direct-dispersed electrospinning. **Synthetic Metals**, v. 162, p. 309–313, 2012.

TEIXEIRA, C. M. L. C. **Obtenção e caracterização de compósitos hidrogel/hidroxiapatita para uso dermatológico**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB.

TEIXEIRA, V.T.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, 2001.

THAYYATH, S.; ANIRUDHAN, PEETHAMBARAN.; DIVYA, L.; NIMA, J. Synthesis and characterization of silane coated magnetic nanoparticles/glycidylmethacrylate-grafted-maleated cyclodextrin composite hydrogel as a drug carrier for the controlled delivery of 5-fluorouracil, Materials **Science and Engineering: C,** v. 55, p. 471-481, 2015.

THE MERCK INDEX. An Encyclopaedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 14. Auflage, 2006, S. 386–387, ISBN 978-0-911910-00-1. Disponivel em: https://www.rsc.org/merck-index

TIEFENAUER. L. X: Magnetic nanoparticles as contrast agents for medical diagnosis. **Nanotechnology in Biology and Medicine. Methods, Devices, and Applications.** v. 29, p.1-20, 2007.

TIETZE, R.; LYER, S.; DÜRR, S.; STRUFFERT, T.; ENGELHORN, T.; SCHWARZ, M.; ECKERT, E.; GÖEN,T.; VASYLYEV,S.; PEUKERT, W.; WIEKHORST, F.; TRAHMS,L.; DÖRFLER, A.; ALEXIOU, C. Efficient drugdelivery using magnetic nanoparticles - biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits, Nanomedicine: **Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. p. 961-971, 2013.

TIVET, F.; SÁ, J. C. DE M.; LAL, R.; MILORI, D. M. B. P.; BRIEDIS, C.; LETOURMY, P.; PINHEIRO, L. A.; BORSZOWSKEI, P. R.; HARTMAN, D. DA CRUZ. Assessing humification and organic C compounds by laser-induced fluorescence and FTIR spectroscopies under conventional and no-till management in Brazilian Oxisols. **Geoderma**, v. 207–208, p.71-81, 2013.

TRAN, N.; WEBSTER, T J. Increased osteoblast functions in the presence of hydroxyapatite-coated iron oxide nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v.7, p.1298–1306, 2011.

TRINCHI, A.; MUSTER, T.H.; COLE, I.S.; DUNLOP, J.B.; COLLOCOTT, S.J. Embedded magnetic nanoparticle sensors for monitoring primer failure beneath paint. **Sensors and Actuators B: Chemical,** v. 210, p. 446-452, 2015.

TUDORACHE, F.; PETRILA, I.; POPA. K.; CATARGIU, A.M. Electrical properties and humidity sensor characteristics of lead hydroxyapatite material. **Applied Surface Science**, v.303, p.175–179, 2014.

TÜRK, S.; ALTINSOY, İ.; ÇELEBIEFE, G.; IPEK, M.; ÖZACAR, M.; BINDAL, C. Microwave–assisted biomimetic synthesis of hydroxyapatite using different sources of calcium, **Materials Science and Engineering: C,** v. 76, n.1, p. 528-535, 2017.

USKOKOVIĆ,V.; HOOVER, C.; VUKOMANOVIĆ, M.; USKOKOVIĆ, D. P.; DESAI, T. A. Osteogenic and antimicrobial nanoparticulate calcium phosphate and poly-(d,l-lactide-co-glycolide) powders for the treatment of osteomyelitis. **Materials Science and Engineering: C,** v.33, p.3362-3373, 2013.

VANITHAKUMARI, R.P. GEORGE, U. KAMACHI MUDALI Influence of silanes on the wettability of anodized titanium. **Applied Surface Science**, v. 292, p. 650–657, 2014.

VASENKO, L.; QU, H. Effect of NH4-N/P and Ca/P molar ratios on the reactive crystallization of calcium phosphates for phosphorus recovery from wastewater, **Journal of Crystal Growth,** v. 459, n.1, p. 61-66, 2017.

VENKATASUBBU, G. D.; RAMASAMY, S.; AVADHANI, G. S.; RAMAKRISHNAN,V.; KUMAR, J. Surface modification and paclitaxel drug delivery of folic acid modified polyethylene glycol functionalized hydroxyapatite nanoparticles. **Powder Technology**, v.235, p. 437-442, 2013.

VERWEY, E. J. W.; HEILMANN, E. L. Physical properties and cátion arrangement of oxides with spinel structures i. cátion arrangement in spinels. **Journal of Chemical Physics,** v. 15, n. 4, p. 174-180, 1947.

VINOD, P. M.; BAHNEMANN, D.; RAJAMONHANAN, R. B.; VIJAYAMOHANAN, K. J. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.107, p.11583, 2003.

VLASOVA, M.; FEDOTOV, A.; MENDOZA TORREZ, I.; KAKAZEY, M.; KOMLEV, V. MARQUEZ AGUILAR, P.A. Mechanosynthesis of hydroxyapatite– ferrite composite nanopowder, **Ceramics International**, v. 43, n.8, p.6221-6231, 2017.

WAEISS, R. A.; NEGRINI, T. C.; A. R.; BOTTINO, A. M. C. Antimicrobial Effects of Drug-Containing Electrospun Matrices on Osteomyelitis-Associated Pathogens, **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Available online 21 January 2014, ISSN 0278-2391, http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2014.01.007.

WANG, H.; HUANG, J.; DING, L.; LI, D. P.; HAN, Y. A facile synthesis of monodisperse CoFe₂O₄/SiO₂ nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 257, p.107-7112, 2011.

WANG, J.; XUE, C.; ZHU, P. Hydrothermal synthesis and structure characterization of flower-like self assembly of silicon-doped hydroxyapatite, **Materials Letters,** v. 196, n.1 p. 400-402, 2017.

WANG, Z.; WEI, P.; QIAN, Y.; LIU, J. The synthesis of a novel graphene-based inorganic–organic hybrid flame retardant and its application in epoxy resin. **Composites Part B: Engineering,** v.60, p.341-349, 2014.

WIJESINGHE, W.P.S.L.; MANTILAKA, M.M.M.G.P.G.; PREMALAL, E.V.A.; HERATH, H.M.T.U.; MAHALINGAM, S.; EDIRISINGHE, M.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; RAJAPAKSE, R.M.G. Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: Effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity. **Materials Science and Engineering: C**, v.42, p.83-90, 2014.

WILLIAMS, R.; KIRKBRIDE, V.; CORCORAN, G. D. Neonatal osteomyelitis in Down's syndrome due to non-encapsulated Haemophilus influenzae, **Journal of Infection**, v.29, p.203-205, 1994.

WONG, S. S.; SMITH, P. R.; AYAZ, A.; SEPKOWITZ, D. Hyperimmunoglobulin E syndrome with persistent vertebral osteomyelitis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Case report and review of the literature. **IDCases**, v 1, p. 12-13, 2014.

WU, H.; LIU, G.; WANG, X. ZHANG, J.; CHEN, Y.; SHI, J.; YANG, H.; HU, H.; YANG, S. Solvothermal synthesis of cobalt ferrite nanoparticles loaded on multiwalled carbon nanotubes for magnetic resonance imaging and drug

delivery. Acta Biomaterialia, v.7, p. 3496-3504, 2011.

WU, H.; ZHENG, O.; DU, J.; YAN, Y.;LIU, C. A new drug delivery system-ciprofloxacine/tricalcium phosphate delivery capsule (CTDC) and its in vitro drug release pattern. **J Tongji Med Univ**, v.17, p.160-4, 1997.

WU, S-H.; WU, J-L.; JIA, S-Y.; CHANG, Q-W.; REN, H-T.; LIU. Y. Cobalt (II) phthalocyanine-sensitized hollow Fe₃O₄@SiO₂@TiO₂ hierarchical nanostructures: Fabrication and enhanced photocatalytic properties. **Applied Surface Science**, v.287 389–396, 2013.

XAVIER, L. R. **Híbridos Orgânicos-Inorgânicos Para Óptica Integrada.** 2010. 50f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro, Portugal.

XIAO, WEI.; FU, H. M; RAHAMAN, N.; LIU, Y. B. BAL, S. H. hydroxyapatite microspheres: A novel bioactive and osteoconductive carrier for controlled release of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v.9, p.8374-8383, 2013.

XU, Y.; ZHOU. Y.; MA, W.; WANG, S.; LI. S. Highly sensitive and selective OFF-ON fluorescent sensor based on functionalized Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles for detection of Zn²⁺ in acetonitrile media. **Applied Surface Science**, v. 276, p. 705–710, 2013.

YAN, S.; ZHANG, X.; SUN, Y.; WANG, T.; CHEN, X.; YIN, J. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles inside nanoporouspoly (L-glutamic acid)/chitosan microcapsules for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.113, p. 302–311, 2014.

YANG, Y-Z.; LIU, X-G.; XU, B-S. Recent advances in molecular imprinting technology for the deep desulfurization of fuel oils. **New Carbon Materials**, v.29, p.1-14, 2014.

YANG, Z-P.; GONG, X-Y.; ZHANG, C-J. Recyclable Fe₃O₄/hydroxyapatite composite nanoparticles for photocatalytic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 165, p.117–121, 2010.

YORUÇ, A. B. H.; AYDINOĞLU, A. The precursors effects on biomimetic hydroxyapatite ceramic powders, **Materials Science and Engineering: C,** v. 75, n.1, p. 934-946, 2017.

YU, L.; HAO, G.; GU, J.; ZHOU, S.; ZHANG, N.; JIANG, W. Fe₃O₄/PS magnetic nanoparticles: Synthesis, characterization and their application as sorbents of oil from waste water. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.394, p. 14-21, 2015.

YUAN, H.; WANG, Y.; ZHOU, S-M.; LOU, S. Fabrication of superparamagnetic Fe₃O₄ hollow microspheres with a high saturation magnetization. **Chemical Engineering Journal**, v. 175, p.555-560, 2011.

YUNOK, O. H, MOORTHY, M. S.; MANIVASAGAN, P.; BHARATHIRAJA, S.; JUNGHWAN OH, Magnetic hyperthermia and pH-responsive effective drug delivery to the sub-cellular level of human breast cancer cells by modified CoFe₂O₄ nanoparticles. **Biochimie**, Available online 2 December 2016.

ZHANG, C.; SI, S.; YANG, Z. Facile synthesis of Fe₃O₄/SiO₂/molecularly imprinted hydroxyapatite nanocomposite and its enhanced photocatalytic degradation of target contaminant. **Separation and Purification Technology**, v 143, 25 p. 88-93, 2015.

ZHANG, NA.; LIU, W.; ZHU, H.; CHEN, L.; LIN, K.; CHANG, J. Tailoring Sisubstitution level of Si-hydroxyapatite nanowires via regulating Si-content of calcium silicates as hydrothermal precursors. **Ceramics International**, v.40, p.11239-11243, 2014.

ZUO, G.; WAN, YIZAO.; ZHANG, YU. Preparation and characterization of a novel laminated magnetic hydroxyapatite for application on gene delivery. **Materials Letters**, v. 68, p. 225–227, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Cálculos Estequiométricos para a obtenção da Fe₃O₄ ou FeFe₂O₄

Para determinar a quantidade em moles da glicina (C₂H₅NO₂)

0 0

$$2[Fe^{+3}(NO_3)_3x9H \neq 0 + n[2x(+4)+5x(+1)+2x(-2)]=n [8+5-4]=9n = 0$$

 $2[1x(+3)+9x(-2)] +9n = 0$
 $-30=-9n$
 $n=-30/-9 = 3,33 g$

Para determinação da quantidade estequiométrica (em gramas) da glicina e dos reagentes, multiplicou-se a quantidade (em mol), dos reagentes, por suas respectivas massas moleculares.

• Para a glicina:

m= *n x MA* = 3,33 mol x 75,07 g/mol = 249,98/100 = 2,49 g

• Para o nitrato de ferro = 2,0 mol x *MA* = 2,0 mol x 404,00 g/mol = 808,000/100 = 8,08 g

Para maior rendimento da reação utilizou-se 3 vezes a massa de cada reagente, obtendo-se:

• Para a glicina: *m*= 2,49 x 3 = 7,5 g

• Para o nitrato de ferro *m* = 8,08x 3= 24,24 g

Total de reagentes (nitrato + glicina) = 31,74 g

APÊNDICE B - Cálculos Estequiométricos para a obtenção da Ferrita de Cobalto (CoFe₂O₄)

Os cálculos feitos a seguir foram realizados para a obtenção da ferrita de cobalto, fórmula química CoFe₂O₄, com relação molar de 1:2:4 mols de Co:Fe:O. Então, de acordo com a teoria dos propelentes e explosivos, o carbono, hidrogênio, cobalto e ferro são considerados como elementos redutores com as seguintes valências de 4⁺, 1⁺, 2⁺ e 3⁺, respectivamente. O oxigênio é considerado como elemento oxidante com valência de 2⁻ e a valência do nitrogênio não é considerada na reação, devido o mesmo ser eliminado como gases de combustão e não como produto. A valência da uréia é 6.

Então, tem-se como exemplo, o cálculo estequiométrico para ureia:

1 [nitrato de cobalto] + 2 [nitrato de ferro] + uréia = 0 1 [Co(NO₃)₂.6H₂O] + 2 [Fe(NO₃)₃.9H₂O] = CO(NH₂)₂ n 1 [(+2) +(6 x (-2)] + 2 [(+3) + 9 (-2)] = -n6 1[-10] + 2[-15] = -n6 -40 = -n6; n = 6,67 mols de ureia

Onde *n* é a quantidade de uréia em mols que se deseja encontrar e 6^+

corresponde a valência total da ureia de acordo com sua fórmula química [C₂H₅NO₂]. Podendo assim, determinar a quantidade estequiométrica (em gramas) dos reagentes, multiplicando-se a quantidade (em moles), de cada elemento pelo peso molar do seu respectivo reagente, como é apresentando a seguir:

Nitrato de ferro: 2 × 327,58 = 655,16g Nitrato de cobalto: 1 × 291,03 = 291,03 g Uréia: 6,67 × 60,06 = 404,31 g

Em seguida a mistura redox (reagente-oxidante e reagente-redutor na estequiometria) foi transferida para os recipientes e submetida ao aquecimento.

APÊNDICE C – Cálculo da quantidade em % de TEOS e APTS

• Para o TEOS temos:

= 之 3 mL de TEOS- 2,5 g de NPM's

d TEOS= 0,934 g/mL

d=m/v ---> 0,934 g/mL =m/3 mL

m=2,802 g de TEOS

Determinando a % de TEOS nas NPM's temos:

2,5 g de NPM's ---- 2,802 g de TEOS ---- 2,5 +2,802 g= 5,0302 g= 100%

5,0302 g ----- 100%

2,802g-----X



- Para o APTS temos:
- d= 1,027 g/mL

4 mL de APTS- 4 g do híbrido

d=m/v → 1,027 g/mL =m/4 mL

m= 4,108 g de APTS

Determinando a % de APTS nas NPM's temos:

4 g de NPM's @TEOS → 4,108 g de APTS → 4,0 +4,108 g= 8,108 g = 100%



APÊNDICE D - Valores de volume de poro (VP) e diâmetro de poro (DP) das amostras

- ✓ Para a (Ca₅(PO₄)₃OH) HJHS
 V_P= 0,044 cc/g......0,44 cm³/g
 R = 19,049 Å = 1,909 nm → D_P= 2xR = 2x1,909 nm = 7,636 nm
 S_{BET} = 23,67 m²g⁻¹
- ✓ Para a (Ca₅(PO₄)₃OH) HL
 Vp= 0,157cc/g.....1,57 cm³/g =
 R= 19,286 Å =1,9286 nm → D_{P=} 2xR=2x 1,9286 nm =3,8572 nm
 S_{BET} = 53,51 m²g⁻¹
- ✓ Para a (Ca₅(PO₄)₃OH) HLC
 Vp = 0,088 cc/g...→....0,88 cm³/g
 R = 14,707 Å = 1,4707 nm→ D_{P=} 2xR = 2x1,4707 nm = 2,9414
 S_{BET} = 66,614 m²g⁻¹
- Para o fármaco (γ)

Vp = 1,148 e⁻¹ cc/g...,0,1148 cm³/g =0,01148 cm³/g = 1,148 cm³/g **R** = 3.448 e¹ Å =34,48 Å= 3,448 nm \longrightarrow D_{P=} 2xR = 2x34,48 Å =68,96 **S**_{BET} =1,080 m²g⁻¹

✓ Para CoFe₂O₄ (CoF)
 Vp= 0,100 cc/g.......1,00 cm³/g
 R= 15,516 Å =1,5516 nm → D_P= 2xR=2x15,516 Å=31,032 Å
 S_{BET} = 36,423 m²g⁻¹

✓ Para CoFe₂O₄ revestida com o TEOS (CoFT).

Vp=0,077 cc/g......0,77 cm³/g **R**=18,743 Å =1,8743 nm \longrightarrow **D**_P=2xR=2x1,8743 nm= 3,7486 nm S_{BET} =22,125 m²g⁻¹

✓ Para CoFe₂O₄ revestidas com o TEOS e APTS (CoFS).

Vp= 0,053 cc/g.......0,53 cm³/g **R**= 28,105 Å = 2,8105 nm \longrightarrow **D**_P= 2xR=2x2,8105 nm=5,621 nm S_{BET} = 19,93 m²g⁻¹

✓ Para Fe₃O₄ (FeF)

Vp= 0,005 cc/g...._),005 cm³/g **R**=18,697 Å =1,8697 nm \longrightarrow **D**_P= 2xR=2x1,8697 nm= 3,7394 nm S_{BET} = 4,487 m²g⁻¹

✓ Para Fe₃O₄ revestida com o TEOS (FeFT).

Vp= 0,009 cc/g.... \longrightarrow 0,1302 cm³/g **R**=15,543 Å =1,5543 nm \longrightarrow **D**_P= 2xR=2x1,5543 =3,1086 nm S_{BET} = 22,125 m²g⁻¹

✓ Para Fe₃O₄ revestida com o TEOS e APTS (FeFS).

Vp= 0,023 cc/g \longrightarrow 0,23 cm³/g = **R**=14,757 Å = 1,4757 nm \longrightarrow **D**_{P=} 2xR=2,9514 nm S_{BET} = 6,880 m²g⁻¹

✓ Para Cγ

Vp=0,001 cc/g \longrightarrow 0,01 cm³/g **R**=17,784 Å =1,7784 nm \longrightarrow DP=2xR=3,5568 nm S_{BET} = 4,640 m²g⁻¹

- Para Fγ
 Vp= 0,003076 cc/g → 0,03076 cm³/g
 R= 39,13 Å = 3,913 nm → DP= 2x 3,913 nm =7,826 nm
 S_{BET} = 1,573 m²g⁻¹
- ✓ Para HC

Vp= 0,014 cc/g \longrightarrow 0,14 cm³/g **R**=16,842 Å = 1,6842 nm \longrightarrow DP= 2x1,6842 nm= 3,3684 nm S_{BET} = 20,208 m²g⁻¹

✓ Para HF

Vp=0,008 cc/g \longrightarrow 0,08 cm³/g **R**=16,790 Å = 1,6790 nm \longrightarrow DP= 2x1,6790= 3,358 nm S_{BET} = 10,229 m²g⁻¹

✓ Para HJCoFSγ₁

Vp=0,004768 cc/g → 0,04768 cm³/g **R**=22,36 Å =2,236 nm → DP=2 x2,236=4,472 nm S_{BET} = 4,265 m²g⁻¹

✓ Para HCoFSγ₁

Vp=0,003 cc/g → 0,03 cm³/g R=17,820 Å= 1,7820 Å → DP=2x 1,7820=3,9845 nm S_{BET} = 9,362 m²g⁻¹

✓ Para HCoFSγ₂

Vp=0,005 cc/g \longrightarrow 0,05 cm³/g **R**=19,154 Å =1,9154 nm \longrightarrow DP= 2x1,9154=3,8308 nm S_{BET} = 9,104 m²g⁻¹

✓ Para HCoFSγ₃

Vp=0,005 cc/g \longrightarrow 0,05 cm³/g **R**=19,141 Å= 1,9141 nm \longrightarrow DP= 2x1,9141 nm=3,8282 nm. S_{BET} = 8,516 m²g⁻¹

✓ Para HJFeFSγ₁

Vp=0,0557 cc/g → 0,557 cm³/g R=38,492 Å = 3,8492 nm → DP= 2x 3,8492= 7,6984 nm S_{BET} = 3,131 m²g⁻¹ ✓ Para HFeFSγ₁

Vp=0,001 cc/g \longrightarrow 0,01 cm³/g **R**= 17,722 Å =1,7722 nm \longrightarrow DP=2x 1,7722 nm = 3,5444 nm S_{BET} = 6,017 m²g⁻¹

✓ Para HFeFS $γ_2$

Vp=0,002 → 0,02 cm³/g R=19,111 Å =1,984 → DP=2x 1,984= 3,968 nm S_{BET} =4,953 m²g⁻¹

Para HFeFSγ₃

Vp=0,002 \longrightarrow 0,02 cm³/g **R**=19,118 Å = 1,9118 nm \implies 2x1,9118= 3,8236 nm S_{BET} =4,009 m²g⁻¹

APÊNDICE E- Determinação da área superficial (*D*_{BET}) determinada por Análise textural por adsorção de nitrogênio - BET

Determinação da área superficial (D_{BET}) determinada por Análise textural por adsorção de nitrogênio - BET

A determinação da área superficial foi determinada por meio da equação o tamanho médio de aglomerados de partículas (diâmetro esférico equivalente) por meio da Equação 6 (Reed, 1996):

$$D_{BET} = \frac{6}{S_{BET} \cdot \rho}$$
(6)

Onde, D_{BET} é o diâmetro médio equivalente (nm), S_{BET} é área superficial determinada pelo método BET (m²/g), ρ é densidade teórica (g/cm³) e 6 é um fator calculado experimentalmente e adotado para partículas de formato consideradas esféricas e sem rugosidade.

A densidade teórica (ρ) utilizada foi obtida de acordo com as fichas cristalográficas do pacote de dados do programa da Shimadzu e do DIFRAC EVA no caso específico do fármaco e se encontram no Anexo IV.

A determinação da área superficial para as amostras revestidas com TEOS e APTS, designadas por: CoFT, CoFS, FeFT e FeFS e os compósitos híbridos foram determinadas com base na (ρ) densidade experimental em (g/cm³), devido a estas amostras serem complexas e formadas por vários constituintes.

- Sabendo-se que 1 cm³-----10⁻⁶ m³
- 1 nm-----10⁻⁹ m Temos:

✓ Para a (Ca₅(PO₄)₃OH) - HJHS

✓ Densidade teórica (ρ) = 3,155 (g/cm³)

$$D_{BET} = \frac{6}{S_{BET} \cdot \rho} \tag{6}$$

D_{BET} = <u>6</u> = 80,34 nm

23,67 m²/g x 3,155 g/cm³

✓ Para a (Ca₅(PO₄)₃OH) – HL

Densidade teórica (ρ) = 3,155 (g/cm³)
$D_{BET} = 6 = 35,54 \text{ nm}$

53, 51 m²/g x 3,155 g/cm³

✓ Para a (Ca₅(PO₄)₃OH) – HLC

Densidade teórica (ρ) = 3,155 (g/cm³)

D_{BET} = <u>6</u> = 28,54 nm

66, 614 m²/g x 3,155 g/cm³

✓ Para CoFe₂O₄ (CoF)

Densidade teórica (ρ) = 5,274 (g/cm³)

D_{BET} = <u>6</u> = 31,24 nm

36,42 m²/g x 5,274 g/cm³

✓ Para CoFe₂O₄ revestida com o TEOS (CoFT).

Densidade experimental (ρ_{exp}) = 4,4455 (g/cm³)

D_{BET} = <u>6</u> = 61,01 nm

22,12 m²/g x 4, 4455 g/cm³

✓ Para CoFe₂O₄ revestidas com o TEOS e APTS (CoFS).

Densidade experimental (ρ_{exp}) = 5,773 (g/cm³)

D_{BET} = <u>6</u> = 52,15 nm

19,93 m²/g x 5,773 g/cm³

✓ Para Fe₃O₄ (FeF)

D_{BET} = 6 = 255,21 nm

4,49 m²/g x 5,236 g/cm³

✓ Para Fe₃O₄ revestida com o TEOS (FeFT).

Densidade experimental (ρ_{exp}) = 4,4736 (g/cm³)

D_{BET} = 6 = 60,63 nm

22,12 m²/g x 4,4736 g/cm³

✓ Para Fe₃O₄ revestida com o TEOS e APTS (FeFS).

Densidade experimental (ρ_{exp}) = 3,6069 (g/cm³)

D_{BET} = <u>6</u> = 241,87 nm

6,88 m²/g x 3,6069 g/cm³

✓ Para Cγ

Densidade experimental (pexp) =3,9594

 $D_{BET} = 6 = 326,61 \text{ nm}$

4, 64 m²/g x 3,9594 g/cm³

✓ Para Fγ

Densidade experimental (pexp) = 3,3147

 $D_{BET} = 6 = 152,9 \text{ nm}$ 1,57 m²/g x 3,3147 g/cm³

✓ Para HC

Densidade experimental (pexp) = 3,4306

 $D_{BET} = 6 = 86,5 \text{ nm}$ 20,21 m²/g x 3,4306 g/cm³

✓ Para HF

Densidade experimental (pexp) = 3,0159

D_{BET} = <u>6</u> = 194,48 nm

✓ Para HJCoFSγ₁

Densidade experimental (pexp) = 3,1493

D_{BET} = 6 = 47,09 nm

 $4,26 \text{ m}^2/\text{g} \times 3,1493 \text{g/cm}^3$

✓ Para HCoFSγ₁

Densidade experimental (pexp) =2,6328

 $D_{BET} = 6 = 366,30 \text{ nm}$

9,36 m²/g x 1,75 g/cm³

✓ Para HCoFS_{γ2}

Densidade experimental (pexp) = 3,1408

 $D_{BET} = \underbrace{6}_{9,10} = 209,93 \text{ nm}$ $9,10 \text{ m}^2/\text{g} \times 3,1408 \text{ g}/\text{cm}^3$

✓ Para HCoFSγ₃

Densidade experimental (pexp) = 3,3205

 $D_{BET} = 6 = 212,08 \text{ nm}$ 8,52 m²/g x 3,3205 g/cm³

✓ Para HJFeFSγ₁

Densidade experimental (pexp) = 3,0108

 $D_{BET} = 6 = 636,94 \text{ nm}$ $3,13 \text{ m}^2/\text{g} \times 3,0108 \text{g/cm}^3$

✓ Para FeFSγ₁

Densidade experimental (pexp) = 2,8647

D_{BET} = <u>6</u> = 348,02 nm

6,02 m²/g x 2,8647g/cm³

✓ Para HFeFSγ₂

Densidade experimental (pexp) = 3,1240

 $D_{BET} = 6 = 388,09 \text{ nm}$

4,95 m²/g x 3,1240g/cm³

✓ Para HFeFSγ₃

Densidade experimental (pexp) = 3,2762

 $D_{BET} = 6 = 456,62 \text{ nm}$

4,01 m²/g x 3,2762 g/cm³

APÊNDICE F – Curva de calibração do fármaco nos híbridos e compósitos híbridos (carreadores).

Por meio do balanço de massa sabe-se que toda quantidade de fármaco adsorvido na partícula deve ser igual a quantidade dessorvida, uma vez que não foi gerado nenhuma substância. A quantidade máxima de fármaco adsorvido ocorrerá se o tempo de dessorção for suficiente e que as forças de ligação entre o absorbato e adsorvente não sejam tão forte a ponto de a dessorção máxima ocorrer.

Conforme os valores referentes a quantidade mássica de fármaco especificada na Tabela 1, foi calculado a quantidade máxima de fármaco que

deverá ser liberada com relação as quantidades iniciais. Para um volume de 100 mL de solução isotônica e 0,2 g de compósito, deverá ser liberado uma massa de 0,0182 g de fármaco. Para um volume de 400 mL de solução isotônica e 0,8 g de compósito deverá ser liberada uma massa de 0,0730 g do fármaco ciproflonax.

Para a curva de calibração do fármaco, uma quantidade de 0,05 g do fármaco foi diluída em 250 mL da solução isotônica, obtendo assim uma solução de concentração 200 µg/mL. A partir desta solução foram feitas diluições obtendo soluções do fármaco nas seguintes concentrações: 1,6 µg/mL; 2,4 µg/mL; 3,2 µg/mL; 4 µg/mL; 5,6 µg/mL; 6,4 µg/mL; 8 µg/mL; 10,4 µg/mL; 15 µg/mL. Essas concentrações foram então utilizadas para a construção da curva de calibração do fármaco ciproflonax.



Pelo gráfico da curva de calibração do fármaco foi possível encontrar a equação da reta: y = 0,0662x + 0,0192. Onde y representa a absorbância e x a concentração. O coeficiente angular é 0,0662 e o coeficiente lienar é 0,0192. Podendo-se afirmar que nessa faixa linear aplica-se a lei de Lambert Beer. Qualquer valor de absorbância fora do intervalo estudado deve-se diluir a solução líquida contendo o adsorbato para conseguir obter valores confiáveis de absorbância e consequentemente das concentrações.

As leituras das absorbâncias dessas concentrações foram realizadas em espectrofotômetro Bel Photonics 2000 UV, na região do ultra visível no comprimento de onda máximo de 275 nm. Este comprimento foi determinado após um scanner da solução do fármaco entre 210 a 300 nm.

APÊNDICE G – Curva de calibração do ciproflonax nos compósitos híbridos sintetizados com a hidroxiapatita comercial da JHS Biomateriais HJFeFS_{γ1} e HJCoFS_{γ1}.

A curva de calibração foi construída e a correlação na faixa linear da lei de Lambert-Beer. Absorbância X Concentração, foi a utilizada para quantificar a concentração do fármaco nos experimentos de liberação dos compósitos híbridos sintetizados com a hidroxiapatita comercial da JHS Biomateriais HJFeFSγ1 e HJCoFSγ1.



As leituras das absorbâncias dessas concentrações foram realizadas em espectrofotômetro Bel Photonics 2000 UV, na região do ultra visível no comprimento de onda máximo de 275 nm. Este comprimento foi determinado após um scanner da solução do fármaco entre 210 a 300 nm.

APÊNDICE H – Cálculo da eficiência de conjugação do fármaco pelo método indireto, direto e conteúdo do fármaco presente nos híbridos, compósitos híbridos (carreadores).

> Para o híbrido (carreador) - $C\gamma$.

A eficiência de conjugação pelo método indireto foi calculada utilizando a Equação (10):

Eficiência de conjugação % =
$$\frac{m \gamma \text{ (inicial)} - m \gamma \text{ (livre) } x100}{m \gamma \text{ (inicial)}}$$
 (10)

 $m\gamma$ (inicial) = massa do fármaco alimentada (inicial), usada na conjugação do híbrido e compósito híbrido

 $m\gamma$ (livre) = massa do fármaco total inicial – massa do fármaco liberada no sobrenadante.

Eficiência de conjugação % (C γ) = <u>0,0182 g - 0,044 g</u> x100 = 75,82 %

0,0182 g

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada usando a equação 11:

Eficiência de conjugação % =
$$\frac{m\gamma \text{ (conjugado)} \times 100}{m\gamma \text{ (inicial)}}$$
 (11)

A fim de evitar o efeito da presença de nanopartículas magnéticas híbridizadas de Fe₃O₄@SiO₂ e CoFe₂O₄@SiO₂ a quantidade de fármaco conjugado foi calculada a partir da absorção da dispersão. Além disso, os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no carreador que é definido de acordo com a equação 12.

Conteúdo de fármaco % =
$$\frac{m \gamma (\text{conjugado}) \times 100}{m \gamma (\text{total do carreador})}$$
 (12)

Conteúdo de fármaco % (C
$$\gamma$$
) = $0.0138 \text{ g} \times 100 = 6.9 \%$
0,2 g

Para o híbrido (carreador) - Fγ.

Eficiência de conjugação % (Fγ) = <u>0,0182 g- 0,0039 g x</u>100 = 78,57 % 0,0182 g

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada usando a seguinte equação:

Os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no carreador

Conteúdo de fármaco % (F γ) = <u>0,0143 g</u> × 100 (3) = 7,15 %

 Para os compósitos híbridos (carreadores) - HFeFSγ1, HFeFSγ2 e HFeFSγ3

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada usando a seguinte equação:

Eficiência de conjugação % (HFeFS_{γ1}) = <u>0,0117 g</u> × 100_= 64,28 % 0,0182 g

Conteúdo de fármaco % (HFeFSγ₁) = <u>0,0117 g</u> × 100 (3) = 5,85 % 0,2 g

Eficiência de conjugação % (HFeFS_{γ2}) = <u>0,0182 g- 0,0073 g</u>x100 = 59,89 % 0,0182 g

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada usando a seguinte equação:

Eficiência de conjugação % (HFeFS_{γ2}) = <u>0,0109 g</u> × 100_= 59,89 % 0,0182 g

Conteúdo de fármaco % (HFeFS_{γ2}) = <u>0,0109 g</u> × 100 = 5,45 % 0,2 g

Eficiência de conjugação % (HFeFS γ_3) = <u>0,0182 g- 0,0008 g x</u>100 = 95,60 % 0,0182 g No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada

No metodo direto, a eficiencia de conjugação foi determinada

Eficiência de conjugação % (HFeFS γ_3) = <u>0,0174 g</u> × 100_ = 95,60 %

0,0182 g

Os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no carreador

Conteúdo de fármaco % (HFeFS γ_3) = <u>0,0174 g</u> × 100 (3) = 8,7 %

 \checkmark Para os compósitos híbridos (carreadores) - HCoFSy1, HCoFSy2, HCoFSy3

Eficiência de conjugação % (HCoFS_{γ1}) = <u>0,0182 g - 0,0116 g</u> x100 = 36,26 % 0,0182 g

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada

Eficiência de conjugação % (HCoFSγ1) = <u>0,0066 g</u> × 100_= 36, 26 % 0,0182 g

Os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no carreador

Conteúdo de fármaco % (HCoFS γ_1) = $0.0066 \text{ g} \times 100 = 3.3 \%$ 0,2 g

Eficiência de conjugação % (HCoFS_{γ2}) = <u>0,0182 g - 0,0078 g x</u>100 = 57,14 % 0.0182 g

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada

Eficiência de conjugação % (HCoFSγ₂) = <u>0,0104 g</u> × 100_= 57,14 % 0,0182 g

Os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no carreador

Conteúdo de fármaco % (HCoFS γ_2) = <u>0,0104 g</u> × 100 (3) = 5,2 %

0,2 g

Eficiência de conjugação % (HCoFS_{γ3}) = <u>0,0182 g- 0,0005 g</u>x100 = 97,25 %

0,0182 g

No método direto, a eficiência de conjugação foi

Eficiência de conjugação % (HCoFS_{γ3}) = <u>0,0177 g</u> × 100_= 97,25 % 0,0182 g

Os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no carreador

Conteúdo de fármaco % (HCoFS γ_3) = $0.0177 \text{ g} \times 100 = 8.85 \%$ 0.2 g

> Para os compósitos híbridos (carreadores) - JHFeFSγ₁ e JHCoFSγ₁.

Eficiência de conjugação % (JHFeFS_{γ1}) = <u>0,0182 g- 0,01433 g</u>x100 = 21,26 % 0,0182 g

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada

Eficiência de conjugação % (JHFeFS γ_1) = <u>0,00387 g</u> × 100_= 21,26 % 0,0182 g

Os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no carreador

Conteúdo de fármaco % (JHFeFS γ_1) = <u>0,00387 g</u> × 100 (3) = 1,93 %

Eficiência de conjugação (JHCoFSγ1) = <u>0,0182 g- 0,012862 g</u> x100 = 29,33 % 0,0182 g

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada

Eficiência de conjugação % (JHCoFS_{γ1}) = <u>0,005338 g</u> × 100_= 29,33 % 0,0182 g

Os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no carreador

Conteúdo de fármaco % (JHCoFS_{γ1}) = <u>0,005338 g</u> × 100 (3) = 2,669 % 0,2 g

Para o compósito híbrido (carreador) obtido pelo método II de inserção do fármaco - HFeFSγ2'

Eficiência de conjugação % (HFeFS_{γ2}') = 0,0182 g - 0,0021 g x100 = 88,46 %

0,0182 g

No método direto, a eficiência de conjugação foi determinada

Eficiência de conjugação % (HFeFS_{γ2}') =<u>0,0161 g</u> × 100_= 88,46 % 0,0182 g

Os resultados obtidos pelo método direto foram usados para calcular a extensão do conteúdo de fármaco no carreador

Conteúdo de fármaco % (HFeFS γ_2 ') = $0.0161 \text{ g} \times 100 = 8.05 \%$ 0,2 g

APÊNDICE I – Cálculo dos valores da DL50

HCoFS_{γ1} log DL50 (mg/kg) = 0,372 log IC50 (mg/mL) + 2,024 log DL50 (mg/kg) = 0,372 x log 514(µg/ mL) + 2,024 DL50 (mg/kg) =1077,651357 mg/Kg Сγ

 $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \log IC50 (mg/mL) + 2.024$ $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \times \log 232 (\mu g/mL) + 2.024$ DL50 (mg/kg) = 801,6070542 mg/KgHCoFS_{γ3} $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \log IC50 (mg/mL) + 2.024$ $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \times \log 145 (\mu g/mL) + 2.024$ DL50 (mg/kg) =673,0214359 mg/Kg Fγ $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \log IC50 (mg/mL) + 2.024$ $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \times \log 2473 (\mu g/mL) + 2.024$ DL50 (mg/kg) = 1933,211506 mg/KgHJFeFS_{γ1} $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \log IC50 (mg/mL) + 2.024$ $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \times \log 451 (\mu g/mL) + 2.024$ DL50 (mg/kg) =1026,48752 mg/Kg HFeFS_{γ3} $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \log IC50 (mg/mL) + 2.024$ $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \times \log 1016 (\mu g/mL) + 2.024$ DL50 (mg/kg) =1388,559389 mg/Kg Solvente $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \log IC50 (mg/mL) + 2.024$ $\log DL50 (mg/kg) = 0.372 \times \log 134 (\mu g/mL) + 2.024$ DL50 (mg/kg) =653,5562693 mg/Kg

ANEXOS

ANEXO I – Reagentes utilizados na obtenção da hidroxiapatita de cálcio (HAp)

1- Hidróxido de cálcio

Fabricante: Vetec Química Fina Nome: Hidróxido de cálcio PA Fórmula química: Ca(OH)₂ Código: 363 ONU Código:3262 Especificações: Sólido Corrosivo, Básico, Orgânico, N.E. Conteúdo: 1000 mg Boletim de Garantia: Teor Ca(OH)₂ Min 95,0% Teor de CaCO₃ Máx 3,0% Insolúvel em HCI Máx 0,1% Cloreto (CI) Máx 0,03% Compostos sulfurados com (SO₄) Máx 0,1% Metais pesados Máx 0,003% Ferro (Fe) Máx 0,05%

Magnésio e sais básicos (como sulfatos) Máx 1,0 %

Ácido fosfórico

Fabricante: Vetec Química Fina Nome: Ácido Fosfórico PA ACS ISSO Fórmula química: H₃PO₄

Código: 1529 ONU 1805

Especificações: Ácido,

Líquido. Conteúdo:

1000 mL

Boletim de garantia: Dosagem Min 85%

Cloreto (CI) Máx 0,0003% Sulfato (SO₄) Máx 0,005% Arsênio (As) Máx 0,0001% Cádmio (Cd) Máx 0,0005% Cobre (Cu) Máx 0,0005% Ferro (Fe) Máx 0,001% Chumbo (Pb) Máx 0,001% Manganês (Mn) Máx 0,0005%

Níquel (Ni) Máx 0,0005% Potássio (K) Máx 0,005% Sódio (Na) Máx 0,05% Zinco (Zn) Máx 0,001%

Ácidos voláteis (m Mol H⁺) Máx 0,02/100g

Anexo II - Descrição técnica e farmacêutica do fármaco (γ) ciproflonax

Cloridrato de ciprofloxacino (ciproflonax)

APRESENTAÇÃO Comprimidos revestidos de 500 mg em embalagens contendo 6, 14 e 500 comprimidos.

USO ORAL USO ADULTO COMPOSIÇÃO Cada comprimido revestido de 500 mg contêm 582 mg de cloridrato de ciprofloxacino monoidratado, equivale a

500 mg de ciprofloxacino. Excipientes: amido, estearato de magnésio, celulose microcristalina, dióxido de silício, povidona, amidoglicolato de sódio, hipromelose, macrogol, polissorbato 80 e dióxido de titânio.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS AOS PROFISSIONAIS DE SAÚDE

1. INDICAÇÕES - Adultos Infecções complicadas e não complicadas causadas por microrganismos sensíveis ao ciprofloxacino. · Trato respiratório: CIPROFLONAX pode ser considerado como tratamento recomendável em casos de pneumonias causadas por Klebsiella spp., Enterobacter spp., Proteus spp., Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Haemophillus spp., Moraxella catarrhalis, Legionella spp. e Staphylococci. CIPROFLONAX não deve ser usado como medicamento de primeira escolha no tratamento de pacientes ambulatoriais com pneumonia causada por Pneumococcus. · Ouvido médio (otite média) e seios paranasais (sinusite), especialmente se a infecção for causada por organismos gram-negativos, inclusive Pseudomonas aeruginosa ou Staphylococci. Olhos. Rins e/ou trato urinário eferente. Órgãos genitais, inclusive anexite, gonorreia e prostatite. Cavidade abdominal (por exemplo, infecções bacterianas do trato gastrintestinal ou do trato biliar e peritonite). Pele e tecidos moles. Ossos e articulações. Sepse. Infecção ou risco iminente de infecção (profilaxia), em pacientes com sistema imunológico comprometido (por exemplo, pacientes em uso de imunossupressores ou pacientes neutropênicos). Descontaminação intestinal seletiva em pacientes sob tratamento com imunossupressores.

2. RESULTADOS DE EFICÁCIA Os resultados das experiências clínicas realizadas e documentadas demonstraram que os microrganismos causadores das infecções foram erradicados em 81,9% dos casos. Clinicamente, quase 94,2% dos pacientes apresentaram melhora acentuada ou recuperação completa. Os resultados das pesquisas clínicas confirmam a excelente atividade in vitro do ciprofloxacino. Os microrganismos mais comuns foram E. coli e Pseudomonas aeruginosa. Os percentuais de erradicação para os patógenos Gram-negativos, tais como a E. coli (95%) Proteus sp (97 - 100%), Salmonella sp (100%), Haemophilus influenzae (95%) e também para os organismos Gram-positivos, Streptococcus pneumoniae (>80%) е Staphylococcus sp (>90%) em particular, juntamente com os resultados

favoráveis contra Pseudomonas aeruginosa (74%), alcançados com tratamento via oral, demonstram o amplo espectro de atividade do ciprofloxacino. Os índices de cura ou melhora das condições clínicas encontrados nas diferentes infecções foram os seguintes: Trato respiratório inferior e superior >85% Trato urinário não complicadas >90% Trato urinário complicadas 97 - 100% Pele e tecidos moles 90% Ossos e articulações 75% Gastrintestinais 100% Bacteremia/septicemia 94% Ginecológicas 92% Otite maligna externa 90% Prostatite crônica 84 - 91%

Anexo III- Relação de impurezas dos reagentes utilizados na síntese das NPM's

Impurezas	Nitrato de Cobre (%)	Nitrato de Ferro (%)	Uréia (%)		
CI	0,001	-	0,005		
SO4	0,005	0,01	0,001		

Tabela 1 - Impurezas dos Reagentes utilizados.

Fe	0,002	-	-
Ca	0,005	0,01	-
Mg	0,001	0,005	-
ĸ	0,01	0,005	-
Na	0,01	0,05	-
Ni	-	-	-
Pb	0,001	-	0,001
Zn	-	-	-
Со	0,01	-	-

PDFNumber Search Print View Data Conversion Window Clear Help PDF # 330664 Quality: * Fe2 03 Fe2 03 For Divide Fee 0.1 X 32.0664 Quality: * Fe2 03 For Divide Fee 0.1 For Divide Fee 0.3 For Divide For Divide
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$

Anexo IV- Ficha utilizada para identificação da fase (Fe₂O₃)

1	S PCPDFWIN		
	PDFNumber Search Print View Da	ta Conversion Window Clear Help	
	🞯 PDF # 221086,Wavelengt	n = 1.54056 (A)	- 🗆 ×
	PDF # 221086, Wavelengtl 22:1086 Quality: * CAS Number: Molecular Weight: 234.62 Volume[CD]: 590.99 Dx: 5.274 Dm: Sys: Cubic Latice: Face-centered S.G.: F3m (227) Cell Parameters: a 8.391 b c α β Y SS/FDM: F30=73(.0120, 34) I/lcor: 2.70 Rad: CuKa1 Lambda: 1.54056 Filter: d:sp: Sign (200) Sign (200) Sign (200)	$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	

Anexo V - Ficha utilizada para identificação da fase (CoFe₂O₄)

4	PCPDFWIN											
	PDFNumber Search Print View Dat	a Conver:	sion Wir	ndow Cl	ear Hel	2						
	😂 PDF # 880315, Wavelength	= 1.54	060 (/	A)								- 🗆 🗙
	88-0315 Quality: C CAS Number:	Fe3 04 Iron Oxi	de La data d G			UD 10						
	MolecularWeight: 231.54 Volume[CD]: 587.43	Ref: Ca	saki, S., A	om ICSD cta Crysta	using PO Illogr., Se	c. B: Struc	stural So	ience, 53, 7	62 (1997)			
	Dx: 5.236 Dm: Sys: Cubic	<u>م</u>										
Ļ	Lattice: Face-centered S.G.: Fd3m (227) Cell Bacanatan	I Slit ensity							_			
l	a 8.375 b c	Fixed				1			96 [.] 68			
l	<u>ه به ب</u>		1	5 3	0	45	60	75	<u>. </u>	•		
l	Rad: CuKa1 Lambda: 1.54060	28	Int-f	hkl	28	Int-f	hk	1 28	Int-f	h k	I	
l	Filter: d-sp: calculated	18.333 30.158	103 296	$ \begin{array}{c} 1 & 1 & 1 \\ 2 & 2 & 0 \end{array} $	53.563 57.100	84 279	42 51	2 74.188	68 30	53 62	3 2	
l	ICSD #: 084611 Mineral Name:	35.522 37.158	999 × 79	3 1 1 2 2 2	62.704 65.932	359 9	44 53	0 79.171	22 4	4455	4 1	
l	Magnetite syn	43.173 47.271	204 5	400 331	66.989 71.142	1 27	44 62	2 86.989 0 89.899	27 97	64 73	2 1	
l												
l												
l												
l												
l												
l												
l												

Anexo VI Ficha utilizada para identificação da fase (Fe₃O₄)

Entretanto, além das fichas da hematita e magnetita foram observados traços da fase westite de acordo com o banco de dados do difract EVA. Como pode-se observar a seguir.



Anexo VII- Fichas utilizadas para identificação da fase (Fe₃O₄)

🞯 PCPDFWIN PDFNumber Search Print View Data Conversion Window Clear Help 这 PDF # 090432,Wavelength = 1.54056 (A) - 0 > Ca5 (P 04)3 (0 H) 09-0432 Quality: I Calcium Phosphate Hydroxide Ref: de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands, ICDD Grant-in-Aid CAS Number: 1306-06-5 Molecular Weight: 502.32 Volume[CD]: 528.80 Ą Dm: 3.080 Dx: 3.155 Fixed Slit Intensity Sys: Hexagonal Lattice: Primitive S.G.: P63/m (176) 78.23 Cell Parameters: c 6.884 a 9.418 Ь hilit a th 11 е, ß 75 45 15 30 60 0 2 8° SS/FOM: F30=54(.0158, 35) I/Icor: Rad: CuKa1 h k 20 h k h k l 28 Int-f 1 Int-f 1 20 Int-f Lambda: 1.54056 43.804 10.820 1 0 0 8 6 30 16 40 1 1 3 63.443 5335445 1 0 12 4 Filter: 16.841 6 1 0 1 1 44.369 0 0 0 3 2 2 1 2 2 0 1 3 2 1 1 0 0 2 0 4 64.078 13 0 2 1 2 1 1 3 422332344013354325 4 3 1 2 3 2 1 d-sp: Guinier 45.305 46.711 Ó O 13 9 4 64.078 65.031 18.785 1 2 1 2 0 3 2 2 0 3 1 18.785 21.819 22.902 25.354 25.879 Mineral Name: 10 0 1 0 0 Hydroxylapatite syn 10 1 48.103 66.386 48.623 49.468 2 1 2 2 0 1 2 0 2 1 66.386 4 3 5 5 4 40 69.699 12 18 50.493 51.283 52.100 28.126 20 12 16 20 4 10 8 4 6 10 12 71.651 4 5 2 4 3 1 2 2 0 1 1 1 28.966 31.773 4 71.651 0 2 Ó 100 72.286 32.196 32.902 34.048 53.143 54.440 55.879 4 7 60 60 25 6 8 1 72.286 0 2 2 53425232 0 0 0 2 1 32323233 4 2 3 73.995 75.022 3 3 9 6 0 2 1 4 3 5 1 5 2 57.128 58.073 35.480 0 75.022 0 1 2 0 3 1 1 4 75.583 76.154 39.204 1 2 1 0 2 0 39.818 20 59.938 ī 2 10 4 40.452 1 60.457 77.175 11 42.029 42.318 1 2 61.660 63.011 4 78.227 9 ò P Pattern List Scan List Peak List Anchor Scan Data R 3000 - n \$ Accepted Ref. Pattern: 00-009-0432 -----Ref. Code Compound Name 01-076-0694 Hydroxylapatite, syn 00-009-0432 Hydroxylapatite, syn Chemical Formula Ca5 (P 04)3 0 H Ca5 (P 04)3 (0 H) 64 M v V 2000 CPS 1000 < Selected Candidate: 01-073-1391 Selected Candidat N. Ref. Code 1 01:085:0828 2 01:085:1895 3 01:085:1043 4 01:075:1158 5 01:075:0571 6 01:075:0571 6 01:075:0571 6 01:075:0571 9 01:084:1263 9 01:084:1263 9 01:084:20458 9 01:087:0673 11 01:082:0458 12 00:044:1481 13 00:004:0733 (U Compound Name Hydrogen Calcium Phosphati Hydrogen Peroxide Hydrogen Peroxide Calcium Hydroxide Displace ^ ᠧ Sc... $\begin{tabular}{l} Chemical Form $H2$ \\ H2 & Ca3 (P 04)2$ \\ H 02 H \\ Ca (0 H)2 \\ Ca (0 H)2$ \\ C$ mula Scale Facto ×i -∰ 0,052 0,066 0,347 11hmÅ 30 40 60 0,293 0,143 on [°2Theta] (Copper (Cu)) Calcium Hydroxid Calcium Hydroxid 0,138 0,136 0,135 0,137 0,137 0,321 0,321 0,181 0,136 ss / 😥 3D / 🔁 2D / 🕼 Compare / 🛄 Analyze / 🛗 Pattern Portlandite, syn Calcium Hydroxide Portlandite, syn Calcium Phosphide litional Graphics d Pattern: Calcium Hydride, 01-073-1391 Residue + Peak Lis oroandite, syn fortlandite, syn Accepted Patterns > 🔤 Default 🔤 IdeAll 🔤 IdeCom 🔤 IdeMin 🔤 MinorMinerals 🔤 PrintideAll 🖕 🛗 🌃 🎲 🏹 🖓 han 🖆 🛣 🛣 🛣 🛣 🔛 🖉 🗸 🗸

Anexo VIII - Fichas utilizadas para identificação da fase hidroxiapatita (Ca₅(PO₄)₃(OH) HL e HLC.

Anexo IX - Fichas utilizadas para identificação da fase hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ da JHS Biomateriais

Name and formula	
Reference code:	01-072-1243
Mineral name: ICSD name:	Hydroxylapatite, syn Calcium Phosphate Hydroxide
Empirical formula: Chemical formula:	Ca ₁₀ H ₂ O ₂₆ P ₆ Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Crystallographic para	ameters
Crystal system: Space group: Space group number:	Hexagonal P63/m 176
a (Å): b (Å): c (Å):	9,4320 9,4320 6,8810
"Alpha ("):	90,0000
Beta (*):	90,0000
Gamma ("):	120.0000



Anexo X - Fichas utilizadas para identificação das fases (γ), cloridrato de ciprofloxacino (ciproflonax).

Commander Sample ID (Coupled TwoTheta/Theta)

