

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

FERNANDO RIBEIRO FERREIRA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROXIAPATITA:
EM PRESENÇA DE GELATINA E ASSOCIADA A SULFATO DE GENTAMICINA

PONTA GROSSA
2009

FERNANDO RIBEIRO FERREIRA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROXIAPATITA:
EM PRESENÇA DE GELATINA E ASSOCIADA A SULFATO DE GENTAMICINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
Aplicada da Universidade Estadual de Ponta
Grossa para obtenção do título de Mestre em
Química Aplicada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane P. F. Borges
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra R. M. Antunes

PONTA GROSSA
2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

F383s Ferreira, Fernando Ribeiro
 Síntese, caracterização e aplicação biológica da
hidroxiapatita : em presença de gelatina e associada a sulfato
de gentamicina. / Fernando Ribeiro Ferreira. Ponta Grossa,
2009.
117f.
Dissertação (Mestrado em Química Aplicada),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Prof. Dra. Christiane P. F. Borges
Co-orientadora : Profa. Dra. Sandra R. M. Antunes

1. Hidroxiapatita. 2. Gelatina. 3. Antibiótico.
4. Sulfato de gentamicina I. Borges, Christiane P. F.
II. Antunes, Sandra R. M. III. T.

CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

FERNANDO RIBEIRO FERREIRA

"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DA HIDROXIAPATITA: EM PRESENÇA DE GELATINA E ASSOCIADA A SULFATO DE GENTAMICINA"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora:

Christiane P. F. Borges
Prof^ª. Dr^ª. Christiane Philippini Ferreira Borges
Departamento de Química, UEPG/PR

Mariza Boscacci Marques
Prof^ª. Dr^ª. Mariza Boscacci Marques
Departamento de Química, UEPG/PR
Departamento de Química, UEPG/PR

Silvia Maria Leite Agostinho
Prof^ª. Dr^ª. Silvia Maria Leite Agostinho
Departamento de Química Fundamental, USP/SP

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Raul e Oralina, por todo o apoio depositado, à minha esposa Luciane, pelo amor incondicional e ao meu filho Lucas, minha paixão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por trilhar meu caminho ao lado de pessoas tão especiais.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Christiane P. F. Borges por sua contribuição e compreensão dedicada ao longo deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada e a UEPG pela oportunidade de realização deste estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada pela disposição em nos oferecer seu conhecimento, incentivo e trabalho, em especial à minha co-orientadora Prof. Dr^a. Sandra Regina M. Antunes, ao Prof. Dr. Fábio André do Santos por sua valiosa ajuda e aos professores Prof. Dr. Augusto Celso Antunes, Prof. Dr. André Victor Chaves de Andrade, Prof^a. Dr^a. Jacqueline Aparecida Marques e ao Prof. Dr. José Caetano Zurita da Silva (*in memoriam*) pelo exemplo de dedicação e profissionalismo, idealizador deste Programa de Pós-Graduação.

Aos colegas Fernando Perotta de Oliveira, amigo e professor, Liliam Cristina Angelo, Marilei Mendes, Rodrigo Sayka e à Fabiane Santos pelos momentos de descontração e companheirismo, mas, especialmente, por toda a ajuda recebida.

A todos os funcionários pelo suporte e pela atenção dispensada e em especial aos técnicos Valdeci e Sandra do DEQUIM/UEPG.

Ao Laboratório da UFPR onde foi realizada análise de MET.

À Universidade Jaume I, Castellon de La Plana pela colaboração com as análises BET.

À CAPES/PROAP pelo suporte financeiro e a todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento desta pesquisa.

*"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

Fernando Pessoa

RESUMO

A utilização de biomateriais remonta à antiguidade e recentemente as biocerâmicas têm sido fortemente investigadas como material para implantes ósseos. Dentre os diferentes biomateriais a hidroxiapatita (HA) possui grande importância por ser um dos compostos que forma a fase mineral óssea. Assim, a HA tem sido amplamente estudada, especialmente pelo fato de ser um composto bioativo. A síntese de fosfatos de cálcio via precipitação apresenta vantagens como baixo custo e simplicidade, mas a maioria dos procedimentos descritos na literatura apresenta formação de produtos não estequiométricos e mistura de fases. Neste trabalho foi estudada a síntese de HA analisando a influência da concentração de gelatina no meio de precipitação nas características da hidroxiapatita obtida. Também foi realizada a incorporação de gentamicina às amostras de HA obtidas e a análise do efeito antimicrobiano. A hidroxiapatita foi obtida através de precipitação em meio aquoso e gelatinoso, sendo posteriormente secada, peneirada e calcinada a 700°C. Foram utilizadas as concentrações de gelatina de 1, 6, 10 e 60 g.L⁻¹. Em seguida, foi efetuada a adição de sulfato de gentamicina na proporção de 1% em massa. As amostras foram caracterizadas por difração de raios X, distribuição do tamanho de partícula, área superficial específica pelo método BET, análise térmica, espectroscopia no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A análise de DRX revelou a presença da fase de HA em todas as amostras e através do refinamento pelo método de Rietveld, verificou-se, para amostra obtida sem adição de gelatina, a presença de carbonato de cálcio, e HA pura para amostra preparada em meio gelatinoso, indicando que a presença de gelatina estabilizou a fase hidroxiapatita. As análises FRX e EDS indicaram que a razão Ca/P ficou ligeiramente acima da esperada para obtenção de hidroxiapatita estequiométrica. A análise de distribuição granulométrica e área superficial pelo método BET indicaram diferenças no tamanho médio de aglomerados e na área superficial do material relativas à síntese e ao processo de preparação das amostras para receber o antibiótico, o qual se processou com moagem em moinho de bolas. As análises de MEV e MET revelaram aspectos morfológicos e estruturais característicos da hidroxiapatita, observando-se formação de aglomerados de cristais nanométricos. A avaliação da atividade microbiológica das amostras frente à saliva humana mostrou que a HA possui efeito inibidor no crescimento microbiano, tem sido observada redução na contagem de UFC. Para as amostras com a adição do antibiótico obteve-se contagem UFC igual a zero comprovando que o processo utilizado para incorporação da gentamicina na HA manteve a propriedade antibiótica do material, e que o mesmo foi liberado durante os testes.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, gelatina, antibiótico, sulfato de gentamicina.

ABSTRACT

The use of biomaterials comes from old times and recently bioceramics have been deeply investigated as a source of material for bone implant. Amongst the different biomaterials, hydroxyapatite (HA) has great importance for being one of the compounds which forms the bone mineral phase. Therefore, HA has been largely studied, mainly due to the fact that it is a bioactive compound. Calcium phosphate synthesis via precipitation presents great advantages such as low cost and simplicity, but most procedures described in literature regard the formation of non stoichiometric products and phase mixture. This work studied the HA synthesis by analyzing the influence of gelatin concentration in the precipitation means on the characteristics of the hydroxyapatite obtained. Gentamicin was also incorporated to the HA samples and antimicrobial activity was analyzed. The hydroxyapatite was obtained through precipitation in aqueous and gelatin means, being later on dried, sieved and calcined at 700°C. Gelatin concentrations of 1, 6, 10 and 60 g.L⁻¹ were used. Then, gentamicin sulfate was added, 1% in mass. Samples were characterized through X-ray diffraction, specific superficial area through the BET method, thermal analysis, infrared spectroscopy and transmission and scanning electronic microscopy. The X-ray diffraction revealed the presence of HA phase in all samples; and by refining through the Rietveld method, it could be seen, in the gelatin free sample, the presence of calcium carbonate and pure HA, for the sample prepared in gelatin, indicating that the presence of gelatin made the hydroxyapatite phase stable. XRF and EDS indicated that Ca/P ratio was slightly above what had been expected to obtain stoichiometric hydroxyapatite. The granulometric distribution analysis and superficial area through the BET method indicated differences in the average size of agglomerates and the superficial area of the material in relation to the synthesis and samples preparation process to receive the antibiotic, which was processed through milling in a ball mill. SEM and TEM revealed morphological and structural aspects characteristic of the hydroxyapatite with the formation of nanometric crystal agglomerates. Samples microbial activity evaluation with human saliva showed that pure HA has the effect of inhibiting microbial growth; CFU counting was observed to reduce. For the samples with antibiotic there was a CFU equal zero proving that the process used for gentamicin incorporation to the HA kept the antibiotic property of the material, and that the same was released during the tests.

Key words: Hydroxyapatite, gelatin, antibiotic, gentamicin sulfate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo do esqueleto humano	17
Figura 2 -	Corte do osso. Representação dos canais de Havers	19
Figura 3 -	Arranjo atômico da hidroxiapatita	29
Figura 4 -	Fórmula estrutural da gentamicina	35
Figura 5 -	Representação estrutural das bactérias Gram-positivas e Gram-Negativas	36
Figura 6 -	Espectro infravermelho comparativo entre amostras de gelatina comercial, hidroxiapatita comercial e HA preparada em meio gelatinoso	40
Figura 7 -	Fluxograma do esquema de obtenção das placas utilizadas para contagem do teste qualitativo.....	62
Figura 8 -	Fluxograma do preparo das amostras de HA para o teste microbiológico quantitativo	63
Figura 9 -	Difratogramas de raios X das amostras de HA obtidas por precipitação em meio aquoso (a) e gelatinoso (b) HA1; (c) HA6; (d) HA10 e (e) HA60 após calcinação a 700°C com passo de varredura 2°/min entre 5 e 90°	65
Figura 10 -	Identificação dos planos através dos índices de Miller “hkl” nos difratogramas das amostras de HA obtidas por precipitação em meio aquoso (a) HAGNT e gelatinoso (b) HA1GNT; (c) HA6GNT; (d) HA10GNT e (e) HA60GNT após calcinação a 700°C com passo de varredura 2°/min entre 5 e 90°	66
Figura 11 -	Difratograma com refinamento por Rietveld da amostra HAGNT.....	68
Figura 12 -	Difratograma com refinamento por Rietveld da amostra HA10	68
Figura 13 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA e HAGNT	75
Figura 14 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA1 e HA1GNT	75
Figura 15 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA6 e HA6GNT	76
Figura 16 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA10 e HA10GNT	76
Figura 17 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA60 e HA60GNT	76
Figura 18 -	Micrografias das amostras HA (A) e HAGNT (B) com aumento de 200x e HA (C) e HAGNT (D) com aumento de 700x	78
Figura 19 -	Micrografias das amostras HA1 (A) e HA1GNT (B) com aumento de 200x e HA1 (C) e HA1GNT (D) com aumento de 700x	79
Figura 20 -	Micrografias das amostras HA6 (A) e HA6PGNT (B) com aumento de 200x e HA6 (C) e HA6GNT (D) com aumento de 700x	79
Figura 21 -	Micrografias das amostras HA10 (A) e HA10GNT (B) com aumento de 200x e HA10 (C) e HA10GNT (D) com aumento de 700x	80
Figura 22 -	Micrografias das amostras HA60 (A) e HA60GNT (B) com aumento de 200x e HA60 (C) e HA60GNT (D) com aumento de 700x	80

Figura 23 -	Micrografias de transmissão das amostras HA (A) e HAGNT (B) com aumento de 120'000x e HA P(C) e HAGNT (D) com aumento de 250'000x (região destacada) a 80kV	82
Figura 24 -	Micrografias de transmissão das amostras HA6 (A) e HA6GNT (B) com aumento de 120'000x e HA6 (C) e HA6GNT (D) com aumento de 250'000x (região destacada) a 80kV	83
Figura 25 -	Micrografias de transmissão das amostras HA10 (A) com aumento de 120'000x e (B) com aumento de 250'000x (região destacada) a 80kV	84
Figura 26 -	Espectro IVTF das amostras de hidroxiapatita sem calcinação (a) HA, (b) HA1, (c) HA6P, (d) HA10 e (e) HA60 obtidas em pastilha de KBr.....	85
Figura 27 -	Espectro IVTF das amostras (a) gelatina pura, (b) HA + gelatina e (c) HA obtidas em pastilha de KBr	87
Figura 28 -	Espectro IVTF das amostras de hidroxiapatita após calcinação a 700°C (a) HA, (b) HA1, (c) HA6, (d) HA10 e (e) HA60 obtidas em pastilha de KBr	88
Figura 29 -	Espectro IVTF das amostras (a) sulfato de gentamicina puro, (b) HA + sulfato de gentamicina puro e (c) HA obtidas em pastilha de KBr	89
Figura 30 -	Espectro IVTF das amostras de hidroxiapatita com adição de 1% em massa do antibiótico (a) HAGNT, (b) HA1GNT, (c) HA6GNT, (d) HA10GNT e (e) HA60GNT obtidas em pastilha de KBr	92
Figura 31 -	Curva TG para amostra HA com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N ₂	93
Figura 32 -	Curva TG para amostra HA1 com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N ₂	94
Figura 33 -	Curva TG para amostra HA10 com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N ₂	94
Figura 34 -	Unidades formadoras de colônia (UFC/ml) dos diferentes microrganismos contidos na saliva, (a) controle BHI puro mais 10 µL de saliva e (b) controle BHI puro mais 100 µL de saliva	95
Figura 35 -	Avaliação da atividade antimicrobiana da amostra de HA com variação da quantidade de material semeado igual a 10, 20 50 e 100 µL, respectivamente nas placas A, B, C, e D incubadas em caldo BHI contendo 0,1 mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar	96
Figura 36 -	Avaliação da atividade antimicrobiana através da contagem das unidades formadoras de colônia das amostras de controle com suas respectivas contagem em UFC de saliva. Os pontos vermelhos representam as colônias contadas em UFC	96
Figura 37 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA com adição de gentamicina (HAGNT.A e HAGNT.B) e sem gentamicina (HA.A e HA.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina	97
Figura 38 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA1 com adição de gentamicina (HA1GNT.A e HA1GNT.B) e sem	

	gentamicina (HA1.A e HA1.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina.....	98
Figura 39 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA6 com adição de gentamicina (HA6GNT.A e HA6GNT.B) e sem gentamicina (HA6.A e HA6.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina	98
Figura 40 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA10 com adição de gentamicina (HA10GNT.A e HA10GNT.B) e sem gentamicina (HA10.A e HA10.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina	99
Figura 41 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de hidroxiapatita HA60 com adição de gentamicina (HA60GNT.A e HA60GNT.B) e sem gentamicina (HA60.A e HA60.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina	99
Figura 42 -	Amostras de controle após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	100
Figura 43 -	Amostras HA sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	101
Figura 44 -	Amostras HA1 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	101
Figura 45 -	Amostras HA6 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	101
Figura 46 -	Amostras HA10 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	102
Figura 47 -	Amostras HA60 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	102
Figura 48 -	Média e erro padrão dos valores transformados em Log(x) de UFC/mL de bactérias totais de saliva expostas à quantidades diferentes de HÁ. *p<0,05 com HA6, **p<0,01 com Controle e ***p<0,001 com HA60 (ANOVA com pós-teste de Bonferroni)	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores para os indicadores de qualidade do refinamento Rietveld para as amostras HAGNT e HA10.....	69
Tabela 2 -	Valores de análise quantitativa de fases as amostras HAGNT e HA10.....	69
Tabela 3 -	Valores da razão Ca/P obtidos por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da amostras sem adição de gentamicina e com adição de gentamicina.....	70
Tabela 4 -	Tipos diferentes de fosfato de cálcio obtidos por diferentes razões Ca/P.....	71
Tabela 5 -	Valores de espectrometria de fluorescência de raios X (FRX) das amostras HA (amostra sem adição de gentamicina), HA10GNT e HA60GNT (amostras com adição de gentamicina)	71
Tabela 6 -	Resumo da distribuição granulométrica das amostras de HA sintetizadas.....	74
Tabela 7 -	Valores de área superficial específica de HA variando a concentração de gelatina durante o preparo das amostras.....	77
Tabela 8 -	Bandas de IV observadas nos espectros das amostras de HA, gelatina e gentamicina.....	90
Tabela 9 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA sem adição e com a adição de gentamicina, incubadas em caldo BHI com 0,1 mL de saliva humana e semeadas em placas de ágar. Contagens após 24 e 48 horas.....	103
Tabela 10 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA sem adição de gentamicina, incubadas em caldo BHI com 0,1 mL de saliva humana e semeadas em placas de ágar. Contagens após 24 e 48 horas para coleta de dados para tratamento estatístico.....	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2	- Posição do pico de Bragg
Å	- Unidade de Angstrom
ASTM	- American Society for Testing and Materials
BET	- Método utilizado na obtenção da área superficial específica
BHI	- Brain Heart Infusion
Ca/P	- Razão molar entre cálcio e fósforo
DRX	- Difração de raios X
DSC	- Calorimetria de varredura diferencial
EDS	- Espectroscopia por energia dispersiva
FRX	- Fluorescência de raios X
IV	- Infravermelho
IVTF	- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
JCPDS	- Joint Committee on Powder Diffraction Standards
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
HA	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio aquoso.
HA1	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 1 g.L ⁻¹
HA6	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 6 g.L ⁻¹
HA10	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 10 g.L ⁻¹
HA60	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 60 g.L ⁻¹
HAGNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio aquoso com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
HA1GNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 1 g.L ⁻¹ com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
HA6GNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 6 g.L ⁻¹ com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
HA10GNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 10 g.L ⁻¹ com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
HA60GNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 10 g.L ⁻¹ com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
R _{wp}	- Índice ponderado da qualidade do refinamento em função dos pontos do perfil
SBF	- Simulated Body Fluid
TCP	- Fosfato tricálcico
TG	- Análise termogravimétrica
UFC	- Unidade formadora de colônia
α-TCP	- Polimorfo de fosfato tricálcico
β-TCP	- Polimorfo de fosfato tricálcico
ν	- Banda de estiramento
δ	- Banda de deformação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1.1	Tecido Ósseo	17
1.1.2	Biomateriais	21
1.1.2.1	Classificação dos Biomateriais	22
1.1.2.2	Aplicação dos Biomateriais	23
1.1.2.3	Biocompatibilidade	25
1.1.2.4	Hidroxiapatita (HA)	27
1.1.3	Antibióticos	33
1.1.3.1	Gentamicina	34
1.1.3.2	Farmacocinética da Gentamicina	37
2	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	39
3.1	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	39
3.2	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	41
3.2.1	Método de Rietveld	42
3.3	AVALIAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA PELO MÉTODO BET.....	44
3.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E DE TRANSMISSÃO (MET)	47
3.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura com Microanálise (EDS)	49
3.5	ANÁLISE TÉRMICA	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA POR PRECIPITAÇÃO EM MEIO AQUOSO.....	53
4.2	SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA POR PRECIPITAÇÃO EM MEIO GELATINOSO	55

4.3	IMPREGNAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HIDROXIAPATITA COM SULFATO DE GENTAMICINA	56
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	57
4.4.1	Teste em presença de saliva	60
4.4.1.1	Teste qualitativo da mistura HA + saliva	61
4.4.1.2	Teste quantitativo (contagem UFC) da amostras de HA impregnadas com gentamicina.....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)	64
5.1.1	Refinamento pelo método de Rietveld	67
5.2	DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA E ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA	74
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	78
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	82
5.5	INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER (IVTF)	85
5.6	ANÁLISE TÉRMICA	93
5.7	TESTE MICROBIOLÓGICO EM PRESENÇA DE SALIVA HUMANA	95
5.7.1	Tratamento estatístico dos dados coletados nas contagens de UFC/mL .	104
6	CONCLUSÕES	107
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	108
8	REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

Dentre muitos materiais utilizados como substituintes ou enxerto nos reparos do tecido ósseo uma classe muito importante é constituída pelos fosfatos de cálcio. Este grupo de biomateriais é estudado há longo tempo e tem se aprimorado constantemente. Os fosfatos de cálcio são utilizados amplamente no reparo de tecidos ósseos injuriados na forma de implantes ou enxertos. Suas propriedades lhes conferem o caráter de biocompatíveis tornando-os fundamentais para a utilização em novos experimentos, sendo por sua vez estudados não somente por suas propriedades como materiais de reconstrução tecidual, mas também pelo seu comportamento frente à exposição ao meio *in vivo*, suas propriedades físicas como resistência à tração, flexibilidade, cristalinidade, tamanho de partículas, além de rotas alternativas de obtenção.¹⁻⁵

Um dos fosfatos de cálcio mais utilizados no reparo de tecidos ósseos é a hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que é um componente da estrutura óssea humana, usado também como reserva de fósforo, e que constitui uma fase menos solúvel dos fosfatos de cálcio, quando obtidos por uma rota convencional do sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{H}_3\text{PO}_4$ em pH básico para a formação da HA, como cita Santos².

Estudos de biocompatibilidade da HA são realizados há algum tempo, e recentemente, seu uso como cimento ósseo, tem sido testado frente a fluidos corporais ou fluidos que simulam a concentração dos minerais constituintes do sangue. Neste caso, temos ainda a possibilidade de infecção do tecido reparado, do qual se deseja extinguir, senão ao menos diminuir, a possibilidade do seu desenvolvimento no período de adaptação durante o tratamento. Assim, um dos

alvos destes estudos é a incorporação de drogas aos compostos derivados dos fosfatos de cálcio e demais biomateriais utilizados como enxertos ósseos.³⁻⁵ As possibilidades de estudo são amplas e a perspectiva de melhoria para o paciente que utiliza o enxerto combinado com a droga é evidente.

Ensaio microbiológico do biomaterial *in vitro* ou *in vivo* permitem avaliar a eficácia da droga testada, estes testes não são utilizados somente para estabelecer um padrão de funcionalidade, mas também para determinação de um valor quantitativo em relação ao percentual da droga permitida na utilização, além de estabelecer um padrão de eficácia em relação à contenção ou eliminação dos microrganismos que possam se desenvolver no local do reparo.⁵

Na avaliação de substituintes teciduais, especialmente ósseos, é possível fazer uma associação entre o enxerto e determinados componentes para aumentar a resistência mecânica do material e a elasticidade, entre outros fatores. Uma possibilidade é a utilização do colágeno, que é um polímero natural, e compõe parte da matriz óssea, dos dentes, da pele, dos tendões e cartilagens, com a intenção de modificar suas propriedades mecânicas.^{7,8}

Outro material que pode ser utilizado na alteração da condição do meio de precipitação ou na associação com a HA é a gelatina, que é obtida pela hidrólise parcial do colágeno. As características de hidrocolóide da gelatina e sua propriedade de formar géis, termicamente reversíveis, garantem uma infinidade de aplicações, tais como agente de gelificação, estabilizante e emulsificante.^{9,10}

Neste trabalho foram obtidas compósitos de HA-gelatina, usando diferentes concentrações de gelatina no meio de precipitação com a intenção de avaliar a melhor concentração para obtenção de um material mais puro através de uma rota alternativa, utilizando os precursores Ca(OH)_2 e H_3PO_4 em presença de gelatina

comercial. Este trabalho também contempla a incorporação de um material antibiótico, o sulfato de gentamicina, associado às amostras de HA e HA-gelatina como agente minimizador de rejeição do tecido substituído, em virtude da utilização clássica deste fármaco nos tecidos ósseo e epidérmico, por possuir boa capacidade de penetração óssea, sendo amplamente usado no tratamento de pacientes que passaram por cirurgias ortopédicas.^{11,12}

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo formado por células e substâncias que promovem a sustentação corporal dos animais vertebrados, contribuindo aproximadamente com 15% do peso do corpo.¹³

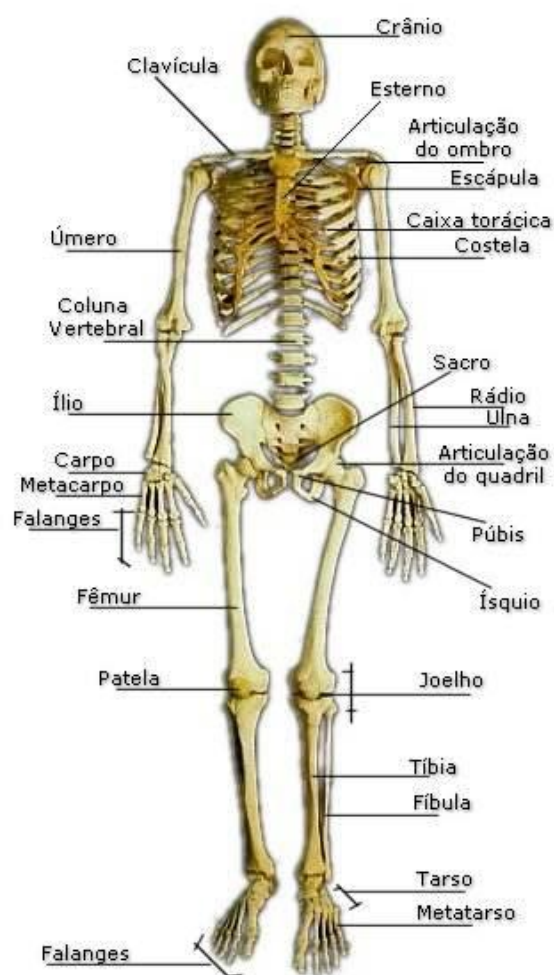


Figura 1 - Modelo de um esqueleto humano¹⁴

A função do tecido ósseo, associada à conformação anatômica do esqueleto, Figura 1, viabiliza aos organismos algumas vantagens fisiológicas

correlacionadas ao hábito de cada espécie, como por exemplo: ponto de inserção dos nervos, apoio aos músculos, adaptações locomotoras, produção de células do sangue, bem como proteção a alguns órgãos vitais (pulmão, coração, cérebro).^{13,15}

Entre os principais componentes dos ossos estão os elementos fundamentais que constituem a fração inorgânica, como os sais de cálcio, o fósforo e o magnésio, conferindo resistência através da formação de cristais responsáveis pela rigidez. É também formado por uma fração orgânica chamada “matriz óssea”, que possui substâncias intercelulares com abundante presença de fibras colágenas e glicoprotéicas, permitindo considerável flexibilidade às unidades ósseas^{14,15}.

Na organização macroscópica de um osso é possível observar duas regiões bem distintas: uma camada compacta mais externa e outra esponjosa interna, contendo, microscopicamente a mesma composição histológica.

Esse tecido é formado por células vivas dispostas em lacunas longitudinais paralelas (perfil vertical) ou lamelas concêntricas com camadas circunscritas a partir de um eixo central, denominado de canal de Havers (perfil horizontal), como mostra a Figura 2. As células que integram esse tecido podem ser: os osteoblastos, produzindo a matriz mesenquimal e os osteócitos, células com baixo potencial metabólico, inseridas na matriz, atuando na manutenção e reposição dos componentes orgânicos¹⁴.

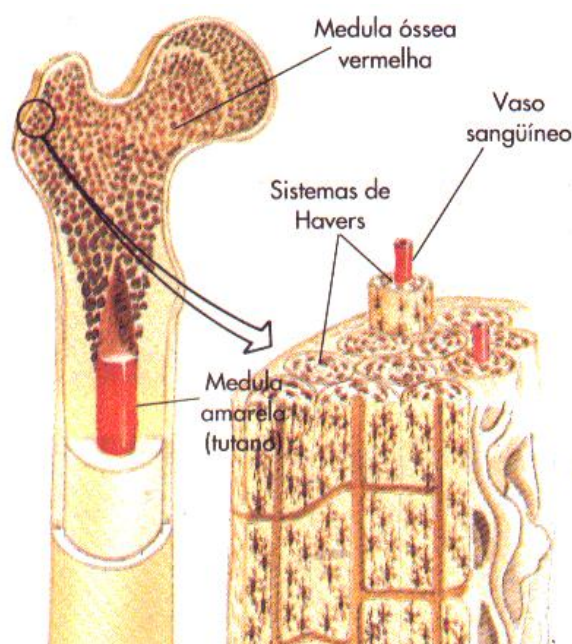


Figura 2 - Corte do osso. Representação dos canais de Havers¹⁶

As células mesenquimatosas indiferenciadas, além da capacidade de se moverem através dos tecidos, têm o potencial de se dividir rapidamente e se diferenciar em células especializadas do tecido músculo-esquelético; como exemplo, em células de cartilagem, osso, tecidos fibrosos densos e músculos. Inúmeros fatores sistêmicos relacionados com a nutrição, o equilíbrio hormonal ou ainda combinados com outros fatores locais, presença de oxigênio, citocinas, nutrientes, entre outros, influenciam a proliferação e a diferenciação das células mesenquimatosas.¹⁷

É importante realçar que o osso, *in natura*, possui uma matriz protéica que perfaz, respectivamente, 70% do volume e 30% do peso do osso; enquanto que a matriz inorgânica, que é formada principalmente pelo fosfato de cálcio, corresponde apenas a 30% do volume e 60% do peso. Os complementos restantes equivalem a outras substâncias, principalmente a água. É conceito básico da Física que a estrutura de subsistência de qualquer substância, produto, objeto ou do próprio

corpo humano é a responsável pela sua resistência e sustentação, assim, é possível entender que o colágeno ósseo, estrutura de sustentação de vários tecidos humanos, inclusive do osso, apresente relação direta entre deterioração e o risco de fratura.^{7,18,19}

Sendo o tecido ósseo altamente vascularizado, todo o esqueleto recebe, a cada minuto, 10% de todo o débito cardíaco, revelando a importância de uma eficaz perfusão sanguínea óssea, para oferecer nutrientes básicos essenciais à adequada síntese de colágeno.^{18,19}

O colágeno torna o material mais resistente e aumenta sua cristalinidade, além de reduzir efeitos como irritabilidade e alergenidade, promovendo ainda a cicatrização de fraturas e a regeneração óssea devido à sua habilidade em facilitar o crescimento. O colágeno é a proteína mais abundante no organismo humano, constituindo cerca de 30% do total das proteínas e 6% do peso corpóreo. Esta proteína é biodegradável e de fácil obtenção, podendo ser extraída de animais ou obtida por síntese.²⁰

Na fase inicial do crescimento ósseo ocorre um contato, estreito, da HA com as fibrilas do colágeno, em locais específicos denominados de “buracos “ que existem entre as fibrilas que compõem a tripla-hélice do colágeno. Essa disposição sobre a matriz protéica básica resulta em um produto bilamelar, que é responsável pelas propriedades mecânicas do osso, sendo portanto capaz de resistir a todo tipo de estresse mecânico.²⁰

Por sua vez, o colágeno confere a todos os tipos de tecidos conjuntivos a sua forma básica e no tecido ósseo é o principal responsável pela resistência tênsil

(resistência à fratura). No entanto, os tipos, as concentrações e a organização do colágeno são variáveis em cada tecido, inclusive no osso.^{18,20}

1.1.2 Biomateriais

A busca incansável do ser humano pela longevidade e por melhores padrões de vida acaba por desencadear a necessidade do estudo, desenvolvimento e aprimoramento de técnicas na área da medicina. Algumas das técnicas desenvolvidas levaram a uma gama de alternativas para o reparo e a substituição de tecidos vivos afetados por traumas, patologias e fraturas entre outros. Estes materiais utilizados para a substituição de tecidos injuriados são denominados de biomateriais.²¹

Biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética e que são toleradas de forma variável, podendo ser absorvidas permanentemente por diferentes tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles podem substituir, por completo ou partes de um tecido vitimado, podendo também fazer parte de tratamento como fonte restauradora parcial.^{12,17}

Em uma visão mais abrangente, um biomaterial é um dispositivo médico elaborado para interagir com sistemas biológicos a fim de realizar seu reparo, podendo ser de origem biológica ou não.^{12,17}

Para ser considerado um biomaterial, vários critérios devem ser atendidos. Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas realizada em 1982², um biomaterial é toda substância ou combinação de substâncias (com exceção de drogas) de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de

um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais. O que significa que estas substâncias são classificadas desta maneira porque consistem em materiais de uso médico, odontológico, veterinário, farmacológico e implantes em contato direto com tecidos do corpo.^{12,17}

1.1.2.1 Classificação dos Biomateriais

De acordo com o comportamento fisiológico, os biomateriais podem ser classificados como:

- *Biotoleráveis*: materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso.
- *Bioinertes*: materiais também tolerados pelo organismo, porém a formação de envoltório fibroso é praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente, sendo os mais utilizados a alumina, a zircônia, o titânio e suas ligas e o carbono.
- *Bioativos*: materiais que estabelecem ligações de natureza química com o tecido ósseo (osteointegração). Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.
- *Absorvíveis*: materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Os principais exemplos são o fosfato tricálcico (TCP) e o ácido polilático.^{2,17}

1.1.2.2 Aplicações dos Biomateriais

Com o aumento no número de pacientes, a ciência médica acaba recorrendo aos avanços na área de biomateriais para suprir as necessidades ocasionadas pelo aumento da população e a melhora da qualidade de vida almejada por uma população que cresce em expectativa de vida. Os problemas com os acidentes de trânsito, além daqueles decorrentes da longevidade da população, como é o caso da osteoporose, são alguns dos fatores que impulsionam o amplo avanço no estudo dos biomateriais.^{2,21,22}

Dos materiais sintéticos utilizados para reparar tecidos ósseos, as cerâmicas (biocerâmicas) são as mais empregadas. Estas se apresentam na forma de pó, revestimento ou próteses, ou ainda, como material de substituição dos tecidos afetados como ossos, juntas e dentes.^{21,22}

Alguns biomateriais são utilizados como cimentos, são materiais que possuem a capacidade de enrijecimento natural ou artificial pela combinação de fases distintas ou recombinação de fases, que pode acontecer pela exclusão da água, como exemplo. Os cimentos de substituição óssea usados como enxertos odontológicos à base de fosfato de zinco e silicato foram desenvolvidos em 1870 e têm sido utilizados até hoje. No início destes estudos houve o desenvolvimento de um cimento de silicato que apresenta excelentes propriedades, tais como cor, translucidez e ainda valor profilático, apresentando ação anticariogênica derivada dos fluoretos presentes em sua composição. Estes cimentos não devem ser tóxicos e devem apresentar forte ligação aos ossos, bem como possuir propriedades mecânicas e químicas que sejam satisfatórias.^{2,4,22}

O cimento ósseo como enxerto é colocado nos espaços vazios entre o implante e a superfície óssea endosteal, que endurece em pouco tempo e assegura a firme colocação da prótese ao preencher por completo o espaço vazio entre o implante e o osso. A aplicação de cimentos ósseos contempla uma série de vantagens das quais três são citadas a seguir:

- as dimensões da cavidade formada no osso para poder fixar a prótese não são tão críticas, pois o cimento proporciona um encaixe ajustável;
- como não é um ajuste exato, não é necessário golpear a prótese ao colocá-la na posição correta, evitando, possíveis fraturas;
- os cimentos aumentam a capacidade de resistência a cargas da prótese ao distribuir uniformemente as tensões entre a prótese e o osso.

Tendo em vista principalmente as desvantagens observadas, procurou-se o desenvolvimento de um material semelhante ao cimento, preparado à base de fosfato de cálcio, que reuniria as vantagens da biocompatibilidade dos biomateriais à base de fosfato de cálcio e dos materiais do tipo do cimento. A partir desta busca, houve a produção das cerâmicas de HA. Este material é produzido por cristalização direta “*in vivo*” e não requer nenhum tipo de aquecimento para a formação de um implante estruturalmente estável. A parte sólida é misturada com a parte líquida, cuja composição pode ser água, sangue, solução salina ou de ácido fosfórico diluído para formar uma pasta que será utilizada para reparar os defeitos ósseos e que ainda pode ser moldada diretamente na cavidade que receberá o preenchimento.^{2,7}

Nas cirurgias ortopédicas muitas vezes há necessidade de realizar grandes substituições do tecido ósseo devido a tumores, infecções e fraturas expostas, o que promove grandes cavidades em função da perda desse material. A utilização de auto-enxertos pode restabelecer a quantidade de massa óssea, porém, em muitos

casos, a quantidade de osso disponível não é suficiente para o preenchimento adequado da cavidade. Tal fato tem provocado a busca de novos materiais que possam atuar no preenchimento dessas cavidades e ainda permitir o aporte local de antibióticos para o tratamento de cavidades infectadas e para prevenção de infecções em fraturas abertas ou em cirurgias de substituição de próteses ou de tumores.^{6,7,8,12,22}

A área de Química pode contribuir de forma significativa para a evolução desta pesquisa e para o aumento do leque de sua aplicabilidade através do desenvolvimento de novos e mais eficazes biomateriais, juntamente com os estudos na área da Medicina que contemplam o esclarecimento dos mecanismos de regeneração óssea associados a materiais coadjuvantes para o pré-tratamento, como na associação com antibióticos. O gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$) e, especialmente a HA, $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, apresentam alta bioatividade, isto é, forte interação cerâmica/tecido ósseo e biocompatibilidade, o que leva este material a ter uma grande aceitação como implante pelos tecidos vivos.^{6,7,17}

1.1.2.3 Biocompatibilidade

A biocompatibilidade dos biomateriais é baseada na compatibilidade com o meio fisiológico que é resultante do fato de que estes materiais podem conter íons comuns àqueles encontrados neste meio (íons cálcio, magnésio, potássio, sódio, bicarbonato, etc.).^{21,23}

A rigor, a biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar danos ao organismo a curto e longo prazo. Além de biocompatível, o

implante deve permitir o desempenho imediato e com eficiência em função da parte que está sendo substituída. Nesse conceito estão incorporados, também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante agressivo - mesmo aos materiais considerados extremamente inertes quimicamente, levando à redução da eficiência do implante.

Um material somente é aceito clinicamente se atende a alguns requisitos, como ser biocompatível, não podendo ser suscetível à degradação causada pelos tecidos (como a corrosão de metais), deve ser biofuncional, cumprindo a função adequada no tempo determinado e finalmente, o material deve ser esterilizável.^{2,7.}

Dentre os biomateriais encontram-se diferentes espécies de classes, sendo minerais ou ainda na forma de ligas metálicas, como Ti e Nb, que são utilizadas como material de substituição. Existem ainda as associações entre os componentes minerais e os metálicos que formam materiais com características diferenciadas, alterando sua dureza, resistência à tração e ainda tamanho de partícula. Cada fator é dependente do modo de como é feita a associação, seja ela durante ou após a síntese do material, como recobrimento ou apenas como dopante por impregnação.^{21,24}

1.1.2.4 Hidroxiapatita (HA)

A HA é um fosfato de cálcio hidratado, que consiste no componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes humanos (cerca de 95%)^{2,17}. Sua fórmula química é representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras *hidróxi* que se refere ao grupo hidroxila (OH^{1-}) presente no material e da palavra *apatita* que designa o mineral. A palavra *apatita* vem do grego e significa “*decepciono*”, em função de ela ser confundida com turmalina e berilo. A hidroxiapatita compõe a parte do esqueleto dos vertebrados e atua também como reserva de cálcio e fósforo.^{2, 25}

A HA sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses, daí o grande interesse em sua produção. Estas propriedades somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, e também eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos.^{2,17,25}

Dois tipos de HA devem ser consideradas: as sintetizadas a altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas a baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos. A HA precipitada por via úmida possui características similares as do tecido ósseo e dentário, diferente da HA sintetizada a altas temperaturas.²

Os fosfatos de cálcio disponíveis para comercialização em geral são hidroxiapatitas extraídas de ossos ou ainda produzidas pela precipitação de íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}). Este material na forma de pó pode ser obtido comercialmente com diferentes tamanhos de cristais. Infelizmente, alguns destes produtos não são livres de impurezas. Um exemplo são alguns tipos de HA com tamanho de partícula variando entre 10 e 40 μm para razão Ca/P = 1,62, enquanto outras possuem valores entre 160 e 200 μm para razão Ca/P de 1,66 a 1,69. A maioria dos fabricantes produz compostos sinterizados que diferem quimicamente das carbonato-apatitas biológicas. A sinterização da HA (dependendo de sua estequiometria) gera a decomposição das fases de fosfato de cálcio para oxiapatita e possivelmente fosfato tetracálcico e fosfato tricálcico (TCP).¹⁴

A extração da hidroxiapatita pode ser feita de osso bovino utilizando um procedimento onde o osso, após ser limpo e triturado, passa por tratamento em soluções de hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, sendo finalmente sinterizado a 1100°C e pulverizado para formação de partículas com tamanho entre 200 e 400 μm . O estágio final deste procedimento inclui a esterilização da hidroxiapatita a temperaturas entre 100 e 150°C.⁴

As cerâmicas de fosfato de cálcio se destacam por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, além da ausência de inflamações e capacidade de ligar-se ao tecido hospedeiro. Estas características podem ser explicadas pela natureza química dos materiais, especialmente pelo fato de serem basicamente formadas por íons cálcio e fosfato, que participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica, como é o caso da hidroxiapatita biológica que possui em sua constituição íons em concentrações diversificadas, tais como Ca^{2+} ,

Mg^{2+} , Na^{+} e CO_3^{2-} , que permitem o controle destes importantes íons nos diversos líquidos corporais por meio de sua liberação e armazenamento.²⁵

Existem padrões de difração de raios X entre a fase mineral dos ossos e a hidroxiapatita que comprovam estas razões de íons e que explica a alta interação entre os tecidos e a hidroxiapatita.²⁵

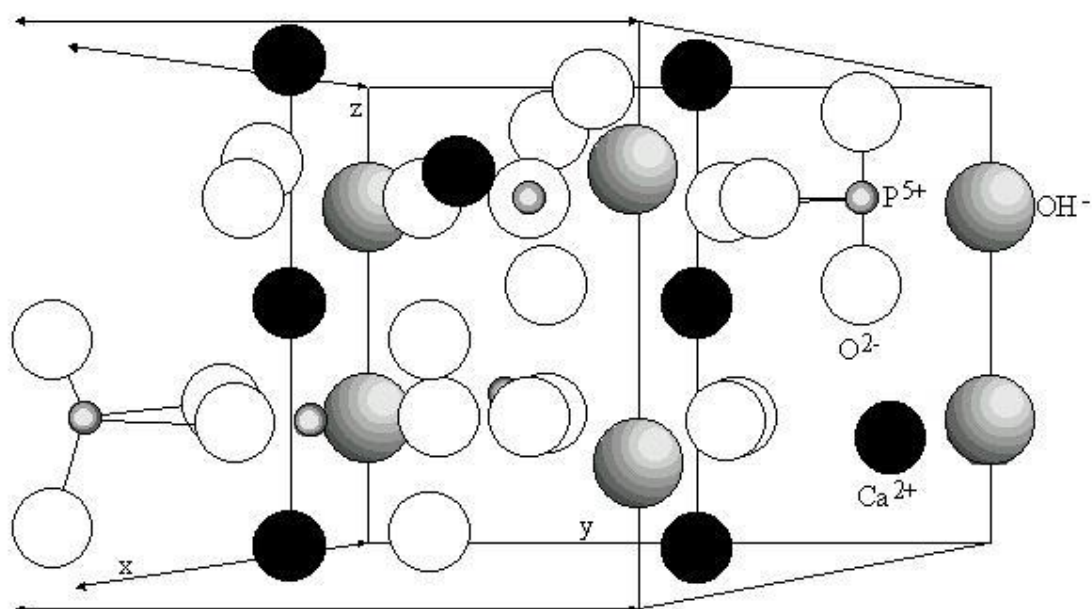


Figura 3 - Arranjo atômico da hidroxiapatita.²⁶

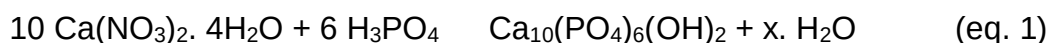
A superfície da HA permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água e, também, proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual. As principais aplicações da HA são: reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas; aumento de rebordo alveolar; coadjuvante na colocação de implantes metálicos; regeneração guiada de tecidos ósseos; reconstrução bucomaxilofacial; equipamentos

percutâneos; reparo e substituição de paredes orbitais; substituição do globo ocular; recobrimento de implantes metálicos.²⁷

Sua estrutura igualmente permite substituições catiônicas e aniônicas com grande facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por metais tais como o Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , entre outros. Os grupos fosfato podem ser substituídos por carbonatos e as hidroxilas por carbonatos, flúor e cloro. Essas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da HA.²⁷

Do ponto de vista biológico, o flúor é uma das impurezas mais importantes da HA dos tecidos calcificados. Nas hidroxiapatitas de ossos e dentes, os carbonatos ocupam sítios dos íons fosfato e dos íons OH^- numa razão de 10:1. O flúor pode ser incorporado à hidroxiapatita substituindo os grupos OH^- , tornando a estrutura mais estável e menos solúvel que a HA estequiométrica. A ação do flúor na proteção de cáries dentárias e no tratamento de osteoporose tem sido muito pesquisada.^{2,25}

Diferentes métodos de obtenção da HA foram propostos utilizando-se soluções aquosas. Um dos métodos é a utilização de nitrato de cálcio como precursor respeitando a proporção de $\text{Ca/P} = 1,67$ como na reação abaixo.¹



(à 100 °C na presença de metanol)

Outras duas rotas possíveis são demonstradas a seguir, uma a partir de hidróxido de cálcio e ácido fosfórico, e que é o método mais convencional, como segue:



O Ca(OH)_2 é menos solúvel na água e, o estado dos íons ortofosfatos depende do pH, a reação de precipitação envolve a dissolução de Ca(OH)_2 , difusão de espécies iônicas como Ca^{2+} e íons hidróxidos, e eletrólise de íons ortofosfatos, tornando complexas as condições de obtenção do pó com as características desejadas. Entretanto, este processo é conveniente para o uso industrial de HA uma vez que o subproduto é água. Após a reação completa e a retirada do excesso de água, obtém-se um gel de HA.



Esta rota é bastante semelhante à rota anterior, obtida a partir do H_3PO_4 e do Ca(OH)_2 especialmente no controle e no produto obtido, já que também há formação de hidroxiapatita e água.¹

Estas três rotas representam maneiras alternativas de se obter a HA a partir de diferentes precursores, podendo ainda variar o meio em que se processa a reação como é o caso da adição de colágeno (meio gelatinoso) ou em fluido de corpo simulado (SBF).^{28,29}

Recentemente, a utilização do processo sol-gel para a síntese de HA tornou-se objeto importante de pesquisa, consiste em um método químico via úmida, o qual dispensa a utilização de alto vácuo e temperaturas elevadas, sendo considerada uma das técnicas mais flexível e promissora. É um método utilizado para a preparação de um pó altamente puro devido à possibilidade de um controle

cuidadoso dos parâmetros do processo, favorecido por uma mistura em nível molecular dos íons cálcio e fósforo que é capaz de melhorar a homogeneidade química e física, resultando geralmente em uma microestrutura de granulometria bastante reduzida e que contém uma mistura de cristais de tamanho da ordem de *submicron* a *nano*, sendo muito importante para melhorar a reação de contato e a estabilidade da interface osso artificial/natural.²⁷

As propriedades mecânicas da hidroxiapatita não são apropriadas para aplicações de resistência à carga (como a ortopedia), sendo utilizada como cobertura em materiais como titânio e suas ligas, onde as propriedades bioativas contribuem enquanto o componente metálico suporta o peso.¹⁷

Substitutos de ossos e implantes reabsorvíveis podem ser produzidos quando a hidroxiapatita e outras variantes de fosfato de cálcio são utilizados na fase cerâmica. Espumas destas cerâmicas têm a habilidade de manter e estimular o crescimento de células humanas; poros com tamanhos variando entre 100 e 200 µm permitem o crescimento de osteoblastos acima e dentro dos poros, levando à formação de osteróides que mineralizam dentro dos poros.²⁸

As condições de processamento são importantes na obtenção de microporosidade, por exemplo, a presença de microporosidade de aproximadamente 1 µm nas paredes dos poros é importante para a fixação efetiva das células e crescimento interno. Tanto a microporosidade quanto a macroporosidade afetam a morfologia celular e o grau de infiltração celular.^{30,31}

O controle de porosidade da hidroxiapatita também permite grande potencial no desenvolvimento de implantes para a liberação lenta de agentes terapêuticos, como é caso da adição de antibióticos como a gentamicina, que acoplada ao biomaterial reduz consideravelmente a possibilidade de rejeição ao implante.^{6-8,32-39}

1.1.3 Antibióticos

A definição do termo antibiótico proposto por Vuillemin⁴⁰ em 1889 era "antibiose" e definia o antagonismo dos seres vivos em geral. O nome antibiótico foi primeiramente usado por Waksman que juntamente com outros microbiologistas, notou que algumas bactérias tinham a capacidade de destruir ou inibir outras, estudando amostras de fezes. Em 1942, Waksman redefiniu antibiótico como substâncias produzidas por microrganismos (bactérias, fungos, actinomicetes), antagonistas ao desenvolvimento ou à vida de outros microrganismos em altas diluições no meio bioquímico do nosso corpo, exceto substâncias que, quando puras, têm uma potente ação antimicrobiana, como os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e o álcool. Entretanto, o uso diário do termo, incluiu os agentes antibacterianos sintéticos, como as sulfonamidas e as quinolonas, que não são produzidos por microrganismos.⁴⁰

A rigor, os antibióticos são um grupo de fármacos utilizados para tratar as infecções causadas por bactérias. Originalmente extraídos de bolores e fungos, hoje podem ser obtidos por síntese química e utilizados para combater diversas doenças infecciosas.

Os antibióticos podem ser divididos em: bactericidas, quando eliminam as bactérias, provocando a destruição da parede bacteriana; e bacteriostáticos, quando detêm o crescimento das bactérias, deixando ao sistema imunológico a tarefa de eliminar a infecção.⁴⁰

Esta classe de fármacos ajuda a combater os sintomas da infecção, quer quando o organismo é atacado por bactérias nocivas, quer quando as bactérias

presentes no organismo se tornam patogênicas. Podem prevenir as infecções, mesmo nos casos em que o sistema imunológico se encontra debilitado.

Alguns antibióticos são eficazes apenas contra certos tipos de bactérias, enquanto que outros, os chamados antibióticos de largo espectro, podem combater uma grande variedade de bactérias.^{40,43} A escolha do fármaco a utilizar pode depender tanto do tipo de bactéria como do local de infecção. Certas bactérias também podem adquirir uma resistência especial a um determinado antibiótico. Isto sucede quando uma bactéria se desenvolve seguindo uma via metabólica que não é bloqueada pela ação do fármaco, ou consegue produzir uma enzima que torna inativo o próprio antibiótico. Existem antibióticos especialmente indicados para o tratamento de infecção graves resistentes a outros antibióticos. Para aumentar a eficácia da terapêutica e diminuir o risco de resistência aos antibióticos, pode também ser prescrito mais do que um antibiótico simultaneamente.^{40,42,43}

1.1.3.1 Gentamicina

A gentamicina ($C_{21}H_{43}N_5O_7 \cdot 2,5H_2SO_4$) é um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos, de baixo custo e amplamente utilizado no tratamento de infecções ósseas, queimaduras, septicemia bacteriana, infecções da pele e do trato intestinal, entre outras.^{32,40,43} A fórmula estrutural da gentamicina é apresentada na Figura 4.

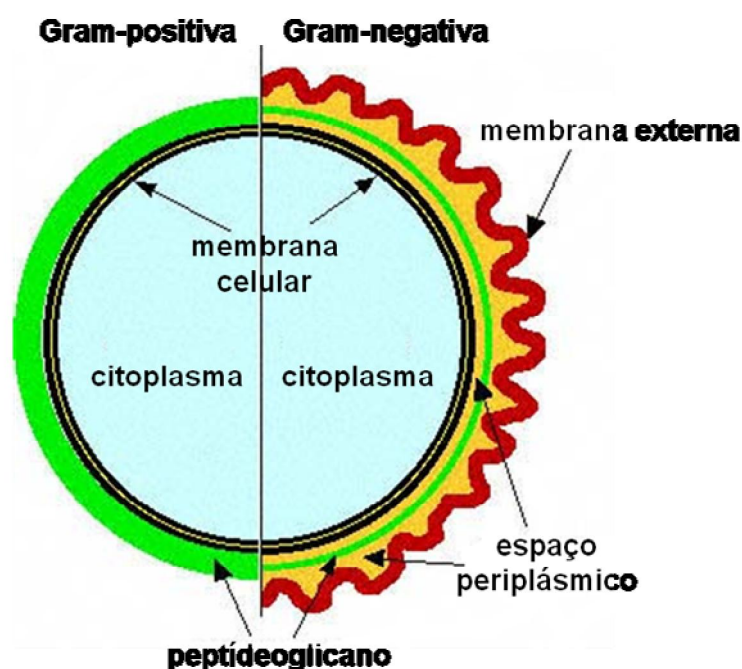


Figura 5 - Representação estrutural das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.⁴¹

A gentamicina é um medicamento bastante eficaz, mas que possui uma ação diferenciada, por se tratar de um antibiótico que é indicado para vários tipos de tratamento, desde uma simples dermatite até determinados tipos infecções no sistema nervoso central. Por este fato, é um medicamento considerado não seletivo, pois age paralela e simultaneamente em várias regiões corpo combatendo diferentes tipos de infecções.⁴²

A escolha do sulfato de gentamicina como antibiótico acoplado ao material utilizado como possível enxerto ósseo se deu devido a propriedades como sua alta solubilidade em água, por ser bastante acessível, isto é, facilidade de compra e custo relativamente baixo, além de sua vasta aplicabilidade no tratamento de doenças ligadas aos tecidos ósseo, muscular e epitelial, regiões diretamente ligadas ao local do implante.

1.1.3.2 Farmacocinética da Gentamicina

A gentamicina não é imediatamente absorvida logo após a administração oral, embora em locais tópicos possa ser absorvida em quantidades significativas desde que as superfícies corporais (exceto a bexiga urinária) sejam irrigadas com o material depois da aplicação local. Já a absorção intramuscular é total e rápida após sua administração.^{45,46}

As concentrações no córtex renal, às vezes, podem ser oito vezes mais altas que os níveis usuais. No líquido cefalorraquídeo (líquido que banha a medula e o cérebro) são baixas e dependentes da dose, do nível de penetração e do grau de inflamação da meninge (delicadas membranas que revestem e protegem o sistema nervoso central, a medula, o tronco encefálico e o encéfalo). A concentração efetiva às secreções brônquicas, a biliar e tecido ocular (regiões de maior concentração aquosa) é bastante pequena.^{37,45}

Nos adultos, logo após a administração intramuscular, observa-se um aumento significativo na concentração sérica de até quatro vezes o da dose única em mg/kg de massa corpórea, representando níveis medidos de 6 a 8 horas após a administração. Após a administração intravenosa, a concentração pode chegar à quantidade de 4 a 6 µg/mL alcançada após um período de tempo máximo entre 30 e 60 minutos.^{37,45,46}

A meia vida da gentamicina é de 2 horas e seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese protéica, ligando-se às proteínas plasmáticas, mas em quantidades desprezíveis. Ela é excretada pelos rins, por meio de filtração glomerular, e encontra-se na urina em forma ativa.⁴⁵⁻⁴⁸

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de gelatina no meio de precipitação durante a síntese de hidroxiapatita e efetuar a incorporação de sulfato gentamicina nas amostras preparadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito de diferentes concentrações de gelatina nas propriedades da hidroxiapatita produzida;
- Testar metodologia para incorporação da gentamicina nos pós de hidroxiapatita preparada com adição de gelatina com o antibiótico;
- Avaliar a atividade microbiológica das amostras preparadas em saliva humana.

3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho (espectroscopia IV) é um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético. Ela se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, denominados, nesse caso, de níveis vibracionais. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibracional.⁴⁹

Se a molécula receber luz com “exatamente” a mesma energia de uma dessas vibrações, então a luz será absorvida desde que sejam atendidas determinadas condições. Para que uma vibração apareça no espectro IV, a molécula precisa sofrer uma variação no momento dipolar durante essa vibração. Não obstante, as frequências de ressonância podem ser, em uma primeira aproximação, relacionadas ao comprimento da ligação e às massas dos átomos em cada ponta. As ligações podem vibrar de seis modos: *estiramento simétrico*, *estiramento assimétrico*, *tesoura*, *rotação*, *wag* e *twist*.⁴⁹

Esta técnica trabalha quase que exclusivamente em ligações covalentes, e é de largo uso na Química, especialmente na Química Orgânica. Espectros bem resolvidos podem ser produzidos com amostras de uma única substância com elevada pureza. Contudo, a técnica costuma ser usada para auxiliar a identificação de misturas bem complexas.⁴⁹

A análise da absorção no infravermelho das amostras de hidroxiapatitas sintetizadas indicará a presença de grupos funcionais, por exemplo, HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , PO_4^{2-} , nas amostras, assim como, dos grupos funcionais do composto que será incorporado e o efeito da incorporação sobre a frequência de vibração de outros grupos funcionais.^{50,51}

As apatitas possuem grupos funcionais característicos como os evidenciados pela Figura 6, onde se observam as bandas de estiramento: O-H a 3540 cm^{-1} e P-O (de PO_4^{3-}) em 1050 cm^{-1} , além das bandas de deformação de P-O (de grupos PO_4^{3-}) em 605 e 561 cm^{-1} . Assim como a hidroxiapatita a gelatina também possui grupos característicos observados pela presença dos estiramentos N-H em 3440 cm^{-1} , C-H em 2960 cm^{-1} e C=O em 1660 cm^{-1} .⁴⁸

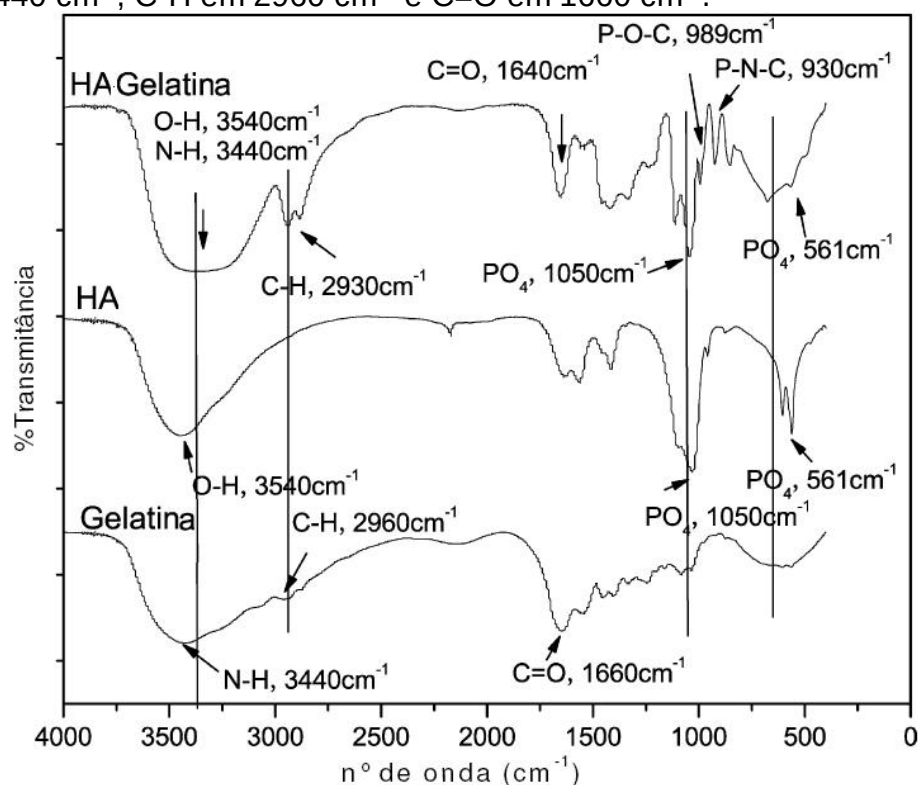


Figura 6 - Espectro infravermelho de gelatina comercial, HA comercial e HA preparada em meio gelatinoso.⁴⁸

3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os raios X são raios eletromagnéticos de comprimento de onda bem determinados produzidos pela aceleração ou desaceleração de elétrons de alta energia. Os raios X estão em um intervalo de comprimento de onda entre 10^{-5} e 10^2 Å e são amplamente usados em análise quantitativa de fase em cristais. Quando este feixe definido difrata em um cristal desconhecido, a medida dos ângulos de difração dos raios emergentes pode elucidar a distância dos átomos no cristal e, conseqüentemente, a estrutura cristalina.^{52,53}

A difração de raios X pela rede cristalina ocorre sobre uma larga faixa angular quando o comprimento de onda dos raios X é da ordem do espaçamento entre planos de átomos. A difração de raios X identificará as linhas de difração correspondentes aos espaçamentos interplanares dos materiais cristalinos. O padrão resultante (espectro), que é composto de espaçamentos planares (no eixo x) e intensidades (no eixo y), pode ser comparado a padrões do Comitê da Junta de Padrões de Difração de Pós (JCPDS) da ASTM para os vários fosfatos de cálcio.⁵²

A difração de raios X é usada para obter características importantes sobre a estrutura cristalina de um composto qualquer. Estas informações são geradas pelo fenômeno físico da difração e também da interferência, ou seja, quando os raios incidem sobre um cristal, ocorre a penetração do raio na rede cristalina e, a partir disso, teremos várias difrações e interferências construtivas e destrutivas, assim, os raios X irão interagir com os elétrons da rede cristalina e serão difratados, permitindo através desta leitura através de um dispositivo capaz de detectar e traçar o desenho da estrutura cristalina, obter informações como presença de fases características e parâmetros de rede.⁵²

3.2.1 Método de Rietveld

O método Rietveld é um método de refinamento estrutural e não um método de determinação estrutural embora constituindo uma parte importante no contexto da caracterização estrutural.⁵³⁻⁵⁵

O método Rietveld utiliza os espectros de difração de raios X e tem como característica fundamental a utilização de um modelo adequado ao estudo a realizar, permitindo extrair dos espectros de difração informações detalhadas da estrutura cristalina e informações analíticas dos materiais.

O modelo estrutural adotado por Rietveld inclui vários tipos de parâmetros de análise, sendo, entre eles:

- Parâmetros da estrutura cristalina;
- Parâmetros do perfil das reflexões;
- Parâmetros da intensidade;
- Parâmetro de correção da orientação preferencial dos cristalitos da amostra.⁵⁵⁻⁵⁷

Estes parâmetros permitem calcular através do algoritmo um espectro modelo adequado à fase que pretendemos estudar, o qual é comparado com o espectro observado e a diferença entre ambos minimizada fazendo variar os parâmetros no modelo estabelecido, utilizando o processo de minimização baseado no princípio dos mínimos quadrados até que o melhor ajuste seja obtido entre o padrão de difração observado experimentalmente e o cálculo de acordo com um modelo que envolve a estrutura cristalina, fatores instrumentais e características da amostra.⁵⁵⁻⁵⁷

O refinamento da análise de difração de raios X é obtido pela análise de Rietveld na qual pode se utilizar um programa como o GSAS para obtenção de parâmetros quantitativos relativos às amostras através do ajuste dos dados de difração usando um modelo matemático baseado em mínimos quadrados. Uma das importantes funções do programa GSAS é a análise quantitativa de fases, além da obtenção dos parâmetros de célula unitária e do volume da célula.^{53,55}

O valor de R_{wp} e o S indicam a qualidade do ajuste do perfil. O R_{Bragg} indica a qualidade do refinamento da estrutura (posições atômicas, ocupação do sítio atômico e deslocamento atômico).^{53,55}

No programa GSAS o valor do *goodness-of-fit*, S , não é obtido diretamente, mas pode ser calculado a partir da equação 4. R_e é o valor estatisticamente esperado para R_{wp} (índice ponderado da qualidade do refinamento em função dos pontos do perfil de difração de raios X). O valor mínimo possível para S é 1 e através da análise da equação 2 é possível verificar que quanto mais próximo de 1 estiver o valor de S , melhor será o refinamento.^{54,59}

$$S = \sqrt{X^2} \quad (\text{eq.4})$$

$$Re = \frac{R_{wp}}{S} \quad (\text{eq.5})$$

onde: X^2 é o índice de ajuste ou qualidade do refinamento.

3.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA PELO MÉTODO BET

Esta análise (também conhecida como ASA – análise de área superficial) mede a área superficial específica por unidade de massa. A sigla BET tem origem em Brunauer, Emmett e Teller, os nomes dos pesquisadores que, em 1938, propuseram este método. A análise de BET é um dos modos mais antigos de caracterização e consiste na medida da fisissorção (adsorção física) de um gás inerte, como o N_2 e pode ser feita por um único ponto ou por vários pontos da amostra.^{58,59}

Existem várias teorias para a medida da área superficial e porosidade utilizando a sorção de gás. Para determinar a área superficial, amostras de sólidos são pré-tratadas aplicando-se combinação de calor e vácuo ou fluxo de gás para remover contaminações adquiridas da exposição à atmosfera. O sólido é então resfriado, sob vácuo. Um adsorbato (material que foi retido pelo processo de adsorção) normalmente utilizado é o gás nitrogênio que é admitido ao sólido em aumentos controlados. Após cada dosagem de adsorbato, a pressão é equilibrada e a quantidade de gás adsorvido é medida. O volume do gás adsorvido a cada pressão, a uma temperatura constante, define uma isoterma de adsorção, da qual a quantidade de gás exigida para formar uma única camada sobre a superfície externa do sólido e seus poros é determinada.^{60,61}

Com a área coberta por cada molécula de gás adsorvido conhecida, a área da superfície pode também ser calculada. À medida que a adsorção continua a espessura da camada adsorvida aumenta.^{60,61}

Os fundamentos da técnica analítica são: uma amostra acondicionada em um tubo sob vácuo é resfriada à temperatura criogênica e exposta a um gás de

análise sob uma série de pressões controladas com precisão. A cada aumento de pressão, o número de moléculas adsorvidas na superfície aumenta. A pressão na qual o equilíbrio da adsorção ocorre é medida e a lei universal dos gases é aplicada para determinar a quantidade de gás adsorvido.^{58,59}

Qualquer microporo na superfície é rapidamente preenchido, fazendo com que a superfície livre se torne completamente coberta e finalmente os poros grandes são cheios. O processo deve continuar até o ponto de condensação volumétrica do gás de análise.

Em seguida o processo de desorção deve começar ao passo que a pressão é sistematicamente reduzida resultando na liberação das moléculas adsorvidas. Assim como no processo de adsorção, a variação na quantidade de gás na superfície do sólido é quantificada. Estes dois conjuntos de dados descrevem as isotermas de adsorção e desorção. As análises das formas das isotermas revelam informações sobre as características da superfície e dos poros do material.^{58,59}

A isoterma de BET utiliza a seguinte equação para representar dados experimentais:

$$\frac{p}{V(p_0 - p)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{c - 1}{V_m c} \frac{p}{p_0} \quad (\text{eq.6})$$

onde: V é o volume de gás absorvido à pressão p ; $(p_0 - p)$ é a pressão de vapor saturada do adsorbato à temperatura de absorção; V_m é capacidade da monocamada; $c-1$ é a constante relativa às energias de adsorção e liquefação do gás. Desse modo, varia-se a pressão p e se obtém os valores de V . Assim, é possível construir um gráfico de $P/V(p_0 - p)$ em função de p ou de p/p_0 e, desse

modo, obter uma reta do tipo $y = ax + b$, sendo possível, pelo valor de c , determinar V_m . Tendo esse valor, obtém-se a área superficial do sólido através da equação:

$$S = \frac{N_{AV} \cdot \sigma \cdot V_m}{V} \quad (\text{eq.7})$$

onde: N_{AV} é o número de Avogadro; V_m é o volume molar igual a $22,410 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 1 atm e 0°C ; σ é a área ocupada por uma molécula.⁵⁹

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E DE TRANSMISSÃO (MET)

O Microscópio Eletrônico de Varredura é um equipamento versátil que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas.⁴⁹ Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação. O aumento máximo conseguido pelo MEV fica entre o microscópio ótico (MO) e o Microscópio Eletrônico de Transmissão. A grande vantagem do MEV em relação ao microscópio ótico é sua alta resolução, da ordem de 2 a 5 nm (20 - 50 Å) - atualmente existem instrumentos com até 1 nm (10 Å) - enquanto que no ótico é de 0,5 µm. Comparado com o MET, a grande vantagem que o MEV possui está na facilidade de preparação das amostras.⁴⁹

Entretanto, não são apenas estas características que fazem do MEV uma ferramenta tão importante e tão usada na análise dos materiais. A elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica. A observação e a análise de fratura tiveram um grande avanço com o uso do microscópio eletrônico de varredura.⁴⁹

O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando

numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes que estes atinjam a amostra analisada.⁴⁹

Um microscópio eletrônico de transmissão consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão entre 5 e 10 mmHg.⁴⁹

Um microscópio de transmissão possui cinco ou seis lentes magnéticas, além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho do feixe eletrônico. Entre estes componentes, destacam-se os três seguintes pela sua importância no processo de difração eletrônica: lente objetiva, abertura objetiva e abertura seletiva de difração. A função das lentes projetoras é apenas a produção de um feixe paralelo e de suficiente intensidade incidente na superfície da amostra.⁴⁹

Os elétrons saem da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas principalmente pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, a lente objetiva entra em ação, formando a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Após este processo importantíssimo da lente objetiva, as lentes restantes servem apenas para aumentar a imagem ou diagrama de difração para futura observação na tela ou na chapa fotográfica.^{49, 50}

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com Microanálise (EDS)

O EDS (*energy dispersive spectrometer*) é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o feixe de elétrons incide sobre um mineral, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local e assim identificar em instantes que mineral está sendo observado. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos ($< 5 \mu\text{m}$), permitindo uma análise quase que pontual.⁴⁹

O uso em conjunto do EDS com a microscopia eletrônica de varredura é de grande importância na caracterização de diferentes materiais, enquanto a MEV proporciona nítidas imagens, o EDS permite sua imediata identificação. Além da identificação mineral, o equipamento ainda permite o mapeamento da distribuição de elementos químicos por minerais, gerando mapas composicionais de elementos desejados.

A MEV tem sido amplamente empregada na caracterização de minerais, sua grande vantagem consiste na observação direta de bordas ou contornos de grãos e na caracterização de porosidade inter e intragranular. Bordas de grãos são locais onde se concentram um grande número de defeitos cristalinos. Caracterizar as microestruturas e identificar seus mecanismos formadores é um passo fundamental

para se conhecer um determinado mineral, bem como prever seu comportamento nas diversas etapas do seu beneficiamento e processamento industrial.⁴⁹

Outro aspecto importante na caracterização de minerais é a determinação de sua composição química. Os microscópios eletrônicos de varredura equipados com detectores de energia dispersiva de raios X são de fundamental importância na determinação da composição dos minerais. Com o MEV-EDS, é possível determinar a composição química pontual das fases que compõem o mineral, constituindo o EDS ferramenta indispensável na caracterização e distribuição espacial de elementos químicos.⁴⁹

3.5 ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica é definida como um grupo de métodos pelos quais as propriedades físicas ou químicas de uma substância, uma mistura e/ou um reativo são medidas como funções de temperatura ou tempo, enquanto a amostra está sujeita a um programa de temperatura controlada. O programa pode consistir em aquecer ou resfriar (dinâmico), ou manter a temperatura constante (isotérmica), ou qualquer seqüência destes.^{49,62,63}

Os métodos térmicos são técnicas de multicomponentes e incluem termogravimetria (TG), análise diferencial térmica e calorimetria de varredura diferencial (DSC). Estes métodos são de grande utilidade para o controle da qualidade e aplicações de investigação sobre produtos industriais como polímeros, farmacos, metais e ligas.^{49,62,63}

Na termogravimetria (TG), a massa da amostra em uma atmosfera controlada é medida como uma função de temperatura ou de tempo. A TG pode ser usada para monitorar qualquer reação que envolve uma fase gasosa como a oxidação ou desidratação. Os estudos podem ser realizados a temperaturas de até 1550 °C. Este método é útil para determinar a pureza e a quantidade de água na amostra. O termograma traça o peso versus a temperatura ou o tempo, gerando assim informação sobre a estabilidade térmica da amostra, velocidades de reação e composição.^{49,62,63}

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) é considerada uma potente técnica na caracterização das estruturas cristalinas ocorridas em um material em função da temperatura. As transições de fase são acompanhadas por alterações na

entalpia do composto, decorrentes de quebra ou formação de ligações ou simplesmente de rearranjos na estrutura cristalina.^{49,62,63}

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA POR PRECIPITAÇÃO EM MEIO AQUOSO

Para obtenção das amostras utilizou-se uma rota onde as fontes precursoras de cálcio e fósforo na síntese são, respectivamente, o hidróxido de cálcio – Ca(OH)_2 – e o ácido fosfórico – H_3PO_4 . Respeitando-se a razão $\text{Ca/P} = 1,67$ utilizou-se o Ca(OH)_2 na concentração de $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e o H_3PO_4 a $1,2 \text{ mol.L}^{-1}$. O meio reacional final constitui um sistema com volume final aproximadamente igual a 500 mL, sendo colocadas quantidades iguais de cada uma das soluções durante a síntese. A reação que expressa a síntese é dada por:



Foi preparada uma única solução de ácido fosfórico para obtenção das amostras precipitadas em meio aquoso e em meio gelatinoso. O ácido fosfórico utilizado foi da marca NUCLEAR[®] (densidade = $1,7 \text{ g.mL}^{-1}$, pureza ou teor = 85%). A solução (suspensão) de hidróxido de cálcio foi preparada individualmente para cada síntese. O hidróxido de cálcio utilizado foi da marca VETEC[®] (teor ou pureza = 95%).

A solução de hidróxido de cálcio foi mantida sob aquecimento de $50^\circ\text{C} (\pm 2,0^\circ\text{C})$ e agitação constante a 1100 rpm, onde posteriormente o ácido fosfórico foi gotejado com velocidade uniforme de 1 gota/s durante a síntese. Durante o processo, o pH foi controlado utilizando-se fita de papel universal (marca MERCK[®]), onde o valor observado foi igual a 12.

Após o período de gotejamento, a agitação e o aquecimento permaneceram constantes por uma hora para completar a síntese e verificar alterações no pH do meio reacional. O pH final foi 7, sendo corrigido a pH 9,0 com a adição de NH_4OH , marca VETEC® (densidade = $0,91 \text{ g.mL}^{-1}$, pureza ou teor = 28%).

Em seguida, a amostra foi identificada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 24 horas, onde o pH se manteve constante. O excesso de sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta graduada e a massa do precipitado foi colocada em um refratário para secagem em estufa à 110°C por 24 horas. Após, a amostra foi deixada em resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente, sendo em seguida triturada e moída com o auxílio de almofariz e pistilo de ágata.

A amostra foi então peneirada em malha de 200 mesh, equivalente a $75 \text{ mm}/\mu\text{m}$. Depois, foi submetida à calcinação em forno JUNG (modelo 0914) com passo de aquecimento igual a $5^\circ\text{C}/\text{minuto}$ até 700°C em atmosfera ambiente para estabilização de fase de HA. O período de residência em forno a 700°C foi de duas horas. Ao final a amostra foi acondicionada em recipiente plástico apropriado aguardando a próxima etapa do procedimento que corresponde à impregnação do material com o antibiótico sulfato de gentamicina.

4.2 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA POR PRECIPITAÇÃO EM MEIO GELATINOSO

Nesta síntese foi seguido o mesmo procedimento citado no item anterior, exceto a adição de gelatina. O método utilizado para preparação da HA em meio gelatinoso foi utilizado por Angelo⁵⁷, tendo sido empregadas diferentes concentrações de gelatina.

Quatro amostras contendo gelatina foram preparadas, nas concentrações 1, 6, 10 e 60 g.L⁻¹, de gelatina comercial Dr. OETKER®. A gelatina foi preparada em 250 mL de água destilada aquecida a 50°C. As soluções de gelatina foram usadas como meio base para preparação da solução de hidróxido de cálcio. De acordo com as concentrações de gelatina utilizadas na síntese as amostras foram denominadas HA1, HA6, HA10 e HA60.

A mistura de hidróxido de cálcio com água e gelatina foi mantida sob aquecimento a 50°C ($\pm 2,0$ °C) e agitação constante, onde posteriormente o ácido fosfórico foi gotejado com velocidade uniforme de 1 gota/s.

Os parâmetros medidos e variações utilizadas para a síntese de HA pura foram mantidos para as amostras com gelatina. O pH resultante de todas as amostras precipitadas em meio gelatinoso foi igual a 9. As amostras foram trituradas, moídas, peneiradas e calcinadas nas mesmas condições descritas para a amostra obtida pela precipitação em meio aquoso.

4.3 IMPREGNAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HIDROXIAPATITA COM SULFATO DE GENTAMICINA

Após o processo de calcinação das amostras foi efetuada impregnação com o antibiótico, sulfato de gentamicina ($C_{21}H_{43}N_5O_7 \cdot 2,5H_2SO_4$) da marca INLAB – PUREX (lote número 829.148).

Foi utilizado um percentual em massa igual a 1% de sulfato de gentamicina para o pó calcinado de HA. A impregnação foi feita a partir da mistura de uma solução alcoólica contendo a massa desejada de sulfato de gentamicina (0,100 g) e adicionada à hidroxiapatita (10,000 g) compondo a mistura com a concentração desejada. O sulfato de gentamicina é um pó branco e higroscópico solúvel em água e parcialmente solúvel em etanol absoluto. Para facilitar a evolução da moagem foi adicionado um excesso de 100 mL de etanol absoluto.

A mistura foi processada em moinho de bolas de porcelana durante 3 horas. O recipiente utilizado foi lavado, seco em estufa e esterilizado em álcool 70% previamente à moagem.

Em seguida, a mistura foi levada à estufa em vidro refratário para secagem durante 24 horas à temperatura de 70°C ($\pm 5^\circ\text{C}$). Após este período foi deixada em resfriamento até temperatura ambiente em dessecador com sílica-gel e, em seguida, armazenada em frascos plásticos esterilizados.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O pó obtido foi caracterizado por técnicas de análise térmica, espectroscopia de infravermelho (IVTF), análise de área superficial pelo método BET, distribuição granulométrica, difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectrometria de energia dispersiva (EDS) acoplada à MEV, espectrometria de fluorescência de raios X (FRX) e análise térmica. A verificação da ação antimicrobiana foi efetuada mediante cultura em meio próprio utilizando-se difusão com ágar em disco com contagens após 24 e 48 horas.

A análise IVTF foi efetuada em aparelho Shimadzu FTIR-8400 em uma faixa de 400 a 4000 cm^{-1} para verificar a presença de grupos funcionais característicos da hidroxiapatita como HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} e PO_4^{3-} nas amostras, assim como, dos grupos funcionais dos materiais que foram utilizados na síntese e na incorporação (a gelatina e o sulfato de gentamicina, respectivamente) e o efeito da incorporação sobre a frequência de vibração de outros grupos funcionais.

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um difratômetro Shimadzu XRD-6000, utilizando radiação de alvo de cobre cujo comprimento de onda é de 1,54060 Å ($k\alpha_1$) com diferença de potencial de 40 kV e corrente de 30 mA. Os resultados obtidos foram comparados com dados encontrados pelo banco de dados JCPDS -“*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*”. As amostras foram submetidas a varredura qualitativa de 5 a 90° com passo de 2°/min e varredura quantitativa pelo método de refinamento de Rietveld através do programa GSAS, adquiridos por análise DRX com intervalo de 2 entre 5 e 130° com passo de 0,02°/min e tempo por passo de 6 segundos.

A análise por MEV foi realizada em microscópio Shimadzu, modelo SS 550 com sistema de microanálise EDS, instalado no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos (LIMAC) da UEPG, sendo as amostras metalizadas com ouro. Para melhor uniformidade da distribuição do pó que foi metalizado, fez-se para cada amostra uma suspensão da própria amostra em meio alcoólico que foi vertida na base de metalização. Após a evaporação (secagem) do álcool estas foram submetidas à metalização.

Das amostras caracterizadas por MEV, foram obtidos os dados de espectrometria de energia dispersiva (EDS) para verificação do percentual atômico em massa dos componentes dos pós. Algumas destas amostras foram submetidas à análise de espectrometria de fluorescência de raios X (FRX) com a intenção de verificar o percentual em massa atômica da composição dos pós obtidos. Essa análise foi realizada em um equipamento Panalytical, modelo Axios Advanced no Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP) em São Paulo.

A análise de distribuição granulométrica foi realizada por difração a laser em um granulômetro modelo Cilas 920N.314 (faixa de 0,3 – 400,0 μm) utilizando-se água sem a presença de agentes dispersantes. Em cada análise foi utilizada uma massa de 200,0 mg ($\pm 1,0$) na quantificação do tamanho de grânulos.

A análise de área superficial específica pelo método BET dos pós das amostras obtidas foi realizada em meio à atmosfera de nitrogênio como gás de adsorção usando um equipamento Quantachrome Autosorb da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sendo a densidade determinada por picnometria de hélio usando um aparelho Quantachrom feita no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos - LIMAC (UEPG).

As análises de MET foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba utilizando um aparelho Jeol modelo JEM 1200 EX II usando aumentos para as amostras de 120 e 250 mil vezes a 80kV.

Análise térmica das amostras foi realizada utilizando um termoanalisador NETZSCH STA 49C do LIEC do Instituto de Química de São Carlos. O aquecimento das amostras foi efetuado até uma temperatura de 1300°C com aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N₂.

4.4.1 Teste em presença de saliva

Após a caracterização e reconhecimento da presença de gentamicina impregnada ao pó de HA através de análise infravermelho (IVTF) foi realizado o teste em presença de saliva humana para verificar sua funcionalidade em meio de cultura de bactérias oriundas desse meio. Previamente a este teste, as amostras submetidas a esse procedimento foram autoclavadas a fim de assegurar sua assepsia durante o teste em presença de saliva.

Este teste foi efetuado com a inoculação da HA (com gentamicina e sem gentamicina) em meio de cultura apropriado (caldo infuso BHI em ágar) para difusão em disco frente com a adição de bactérias de saliva humana para contagem de unidades formadoras de colônia no Laboratório de Análise Microbiológica (M-88) da UEPG. As contagens foram realizadas após os períodos de incubação de 24 e 48 horas em estufa à 37°C, através da análise das fotografias (adquiridas com uma câmera digital Sony Cybershot DSC 707) do material com o auxílio do software *Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics)*.

A metodologia foi desenvolvida através da realização de testes de controle iniciais para verificar a dosagem necessária de HA e da saliva humana para uma melhor contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). O teste inicial foi de caráter qualitativo e determinante para uma quantidade padrão de saliva que seria utilizada na padronização dos testes com a hidroxiapatita.

O teste consistiu em adicionar diferentes quantidades do pó de hidroxiapatita e coleta de diferentes alíquotas do caldo formado (hidroxiapatita+saliva+meio de cultura) para formação do meio analítico padronizado.

4.4.1.1 Teste qualitativo da mistura HA + saliva

A seguir é descrito o procedimento para determinação da quantidade de HA+saliva utilizada na formação do meio padrão:⁴¹ Na Figura 7 é apresentado o fluxograma do procedimento utilizado nos testes qualitativos.

1. Primeiramente foi feita a coleta da saliva em recipiente estéril apropriado. Quatro tubos de ensaio foram preparados utilizando uma quantidade igual a 2 mL do meio de cultura (caldo tipo BHI – infusão de cérebro e coração) em comum. Ao tubo “A” foram adicionados 25 mg de HA + 0,1 mL de saliva, ao tubo “B” foram adicionados 50 mg de HA + 0,1 mL de saliva, ao tubo “C” foi adicionado somente 0,1 mL de saliva e ao tubo “D” nada foi adicionado permanecendo apenas o caldo BHI. As amostras de hidroxiapatita foram submetidas previamente a autoclave para assegurar a assepsia do material. Os quatro tubos foram homogeneizados e deixados para incubação por 24 horas a 37°C em estufa. As amostras de HA utilizadas (tubos A e B) neste teste são isentas de gentamicina.
2. Após o período de 24 horas os tubos foram retirados da estufa, homogeneizados em vortex e submetidos a teste de cultura em placa de Petri com ágar + BHI. De cada tubo citado anteriormente foram retiradas alíquotas de 10, 20, 50 e 100µL de material para cultivos nas placas, sendo realizados em duplicata (duas placas de Petri para cada alíquota) para o material presente nos tubos anteriormente citados. Em cada placa de Petri foi semeado o material e a aplicação destas alíquotas foi realizada utilizando-se alça de Drigalsky de acordo com procedimento padrão de análise microbiológica. Os testes contendo as amostras de HA sem gentamicina

foram efetuados para verificar se a HA possui algum tipo de propriedade inibidora ao crescimento de microrganismos.

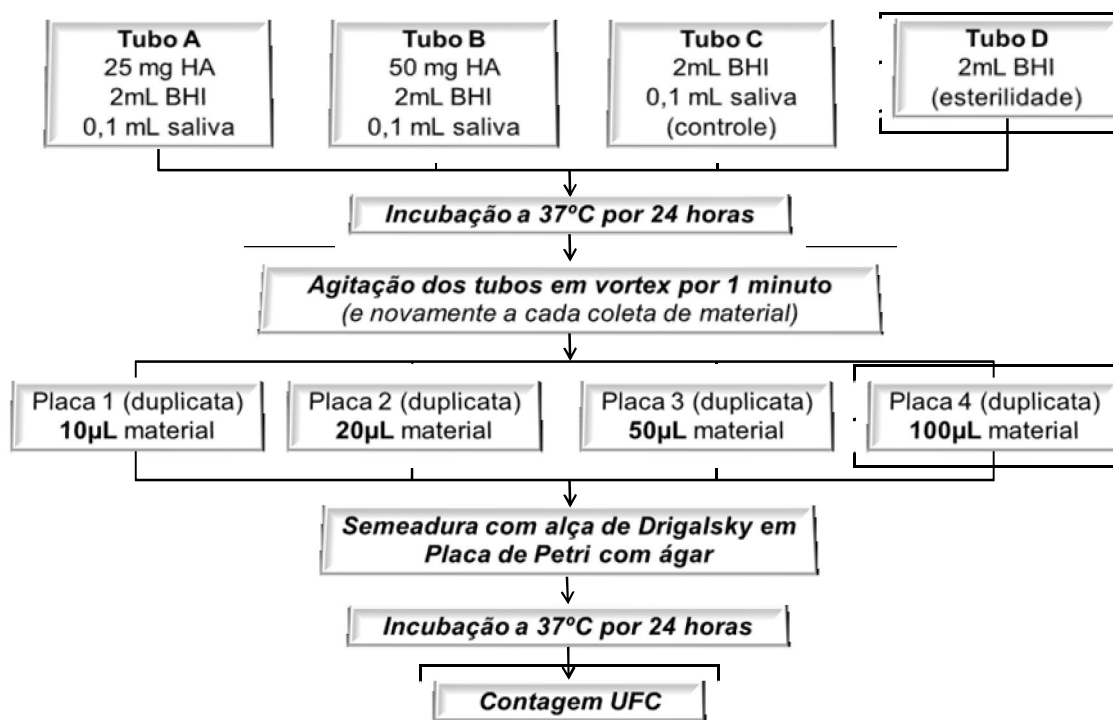


Figura 7 - Fluxograma do esquema de obtenção das placas utilizadas para contagem do teste qualitativo.

3. Após o período de incubação de 24 horas com o auxílio de máquina fotográfica digital estativa Sony Cybershot DSC 707 com 5.0 megapixels de resolução, foram adquiridas as imagens de cada placa que em seguida foram submetidas à contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) utilizando o software “Image Pro-Plus 4.5” (Media Cybernetics). A Figura 8 mostra a formação de colônias de bactérias dos tubos com as amostras de controle.

4.4.1.2 Teste quantitativo (contagem UFC) da amostras de HA impregnadas com gentamicina.

O teste qualitativo permitiu a decisão pela utilização da mistura de 25 mg de HA + 0,1mL de saliva cultivada por 24 h (estendido a 48 h para observação de colônias com melhor definição) em BHI e desse material somente 10 μ L foram aproveitados para a semeadura de acordo com mesmo procedimento para o cultivo nas placas utilizando as amostras de HA sem a adição de gentamicina e com a adição de gentamicina (Figura 8). Através deste teste foi verificada a funcionalidade da gentamicina associada à HA.

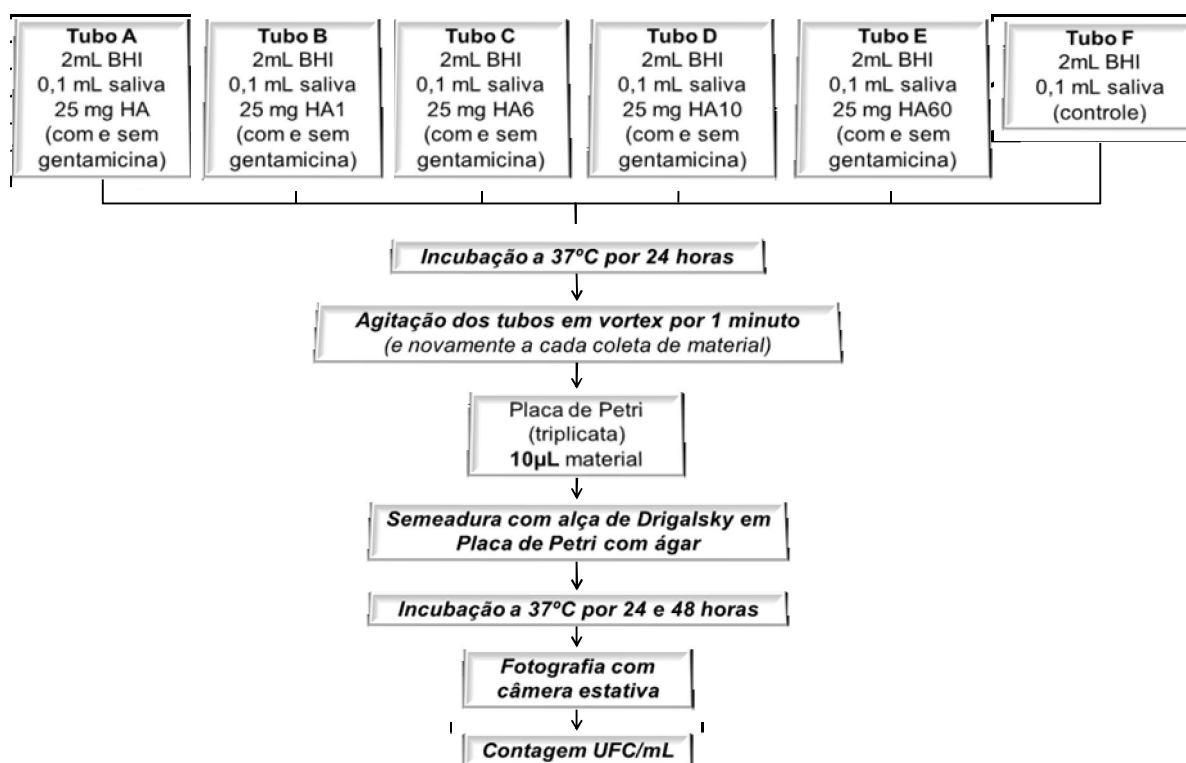


Figura 8 - Fluxograma do preparo das amostras de HA para o teste microbiológico quantitativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A análise de raios X foi realizada com a intenção de verificar a existência da fase de HA e demais fases que possam ser obtidas pela síntese através da rota sugerida, na qual se usou $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4 em pH alcalino em diferentes meios de precipitação (aquoso e gelatinoso). A análise poderá ainda indicar a existência de fases oriundas da presença de sulfato de gentamicina.

A análise dos picos característicos da fase de hidroxiapatita foi realizada com o banco de dados JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*).^{64,65}

Na Figura 9 está apresentado o conjunto dos difratogramas obtidos pela análise das amostras HA, HA1, HA6, HA10 e HA60.

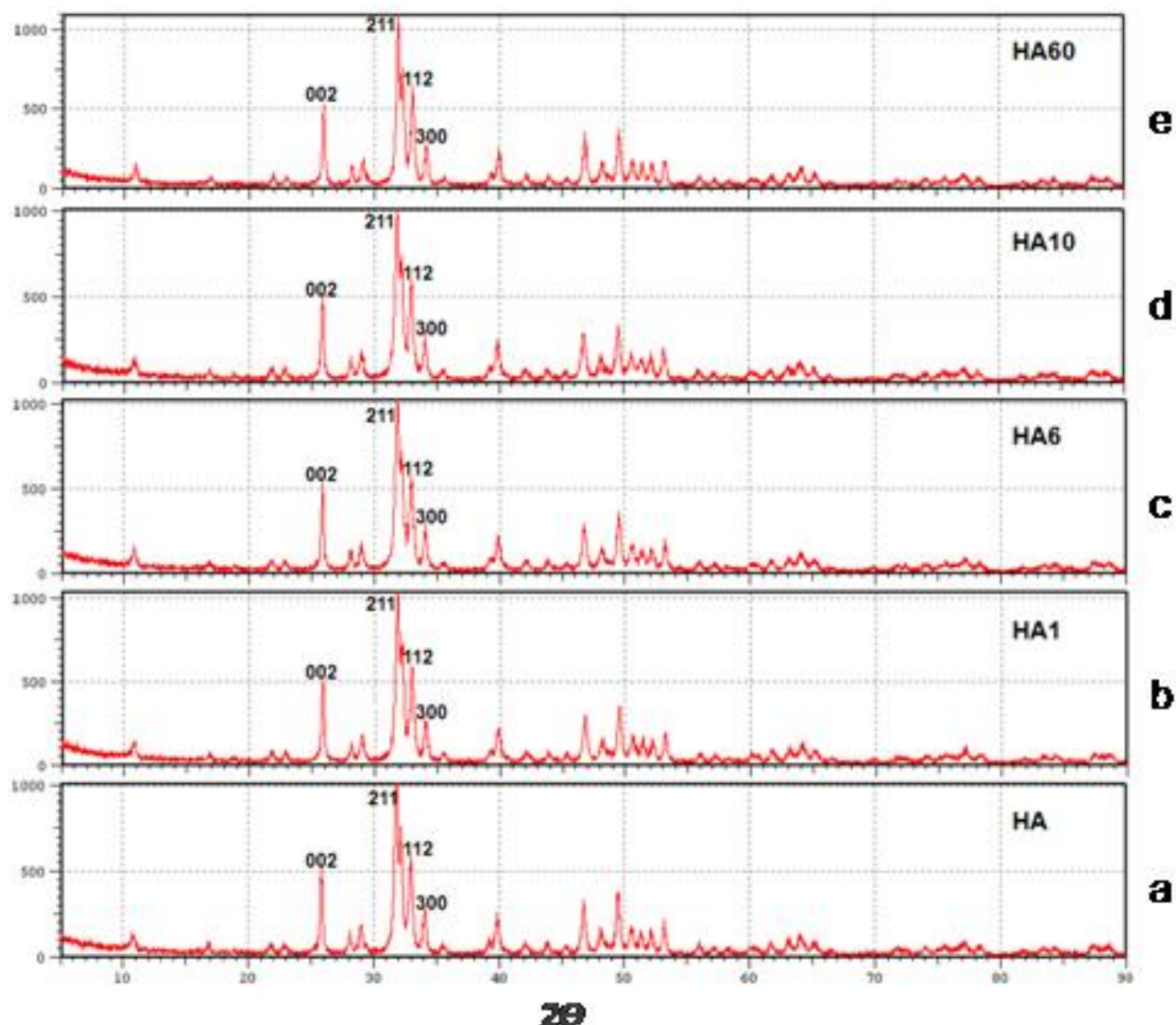


Figura 9 - Difratomogramas de raios X das amostras de HA obtidas por precipitação em meio aquoso (a) e gelatinoso (b) HA1; (c) HA6; (d) HA10 e (e) HA60 após calcinação a 700°C com passo de varredura 2°/min entre 5 e 90°.

Na Figura 9, observa-se pela análise dos difratogramas que a amostra obtida por precipitação em meio aquoso (HA) e as obtidas por precipitação em meio gelatinoso (HA1, HA6, HA10 e HA60) nas concentrações 1, 6, 10 e 60 g.L⁻¹ de gelatina apresentaram a fase de hidroxiapatita [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂], sendo esta fase identificada em 2^o pelos picos de reflexões características em 25,9°, 31,6°, 32,9° e 33,9° que representam, respectivamente, os planos de difração 002, 211, 112 e 300.^{59, 64-66}

A Figura 10 mostra os difratogramas das amostras HAGNT, HA1GNT, HA6GNT, HA10GNT e HA60GNT que diferem das anteriores pela presença do sulfato de gentamicina. Nessas amostras foi realizada a adição do sulfato de gentamicina após o processo de calcinação a 700°C. A análise dos difratogramas revela o mesmo conjunto de planos característicos da fase de hidroxiapatita nas reflexões citadas anteriormente.

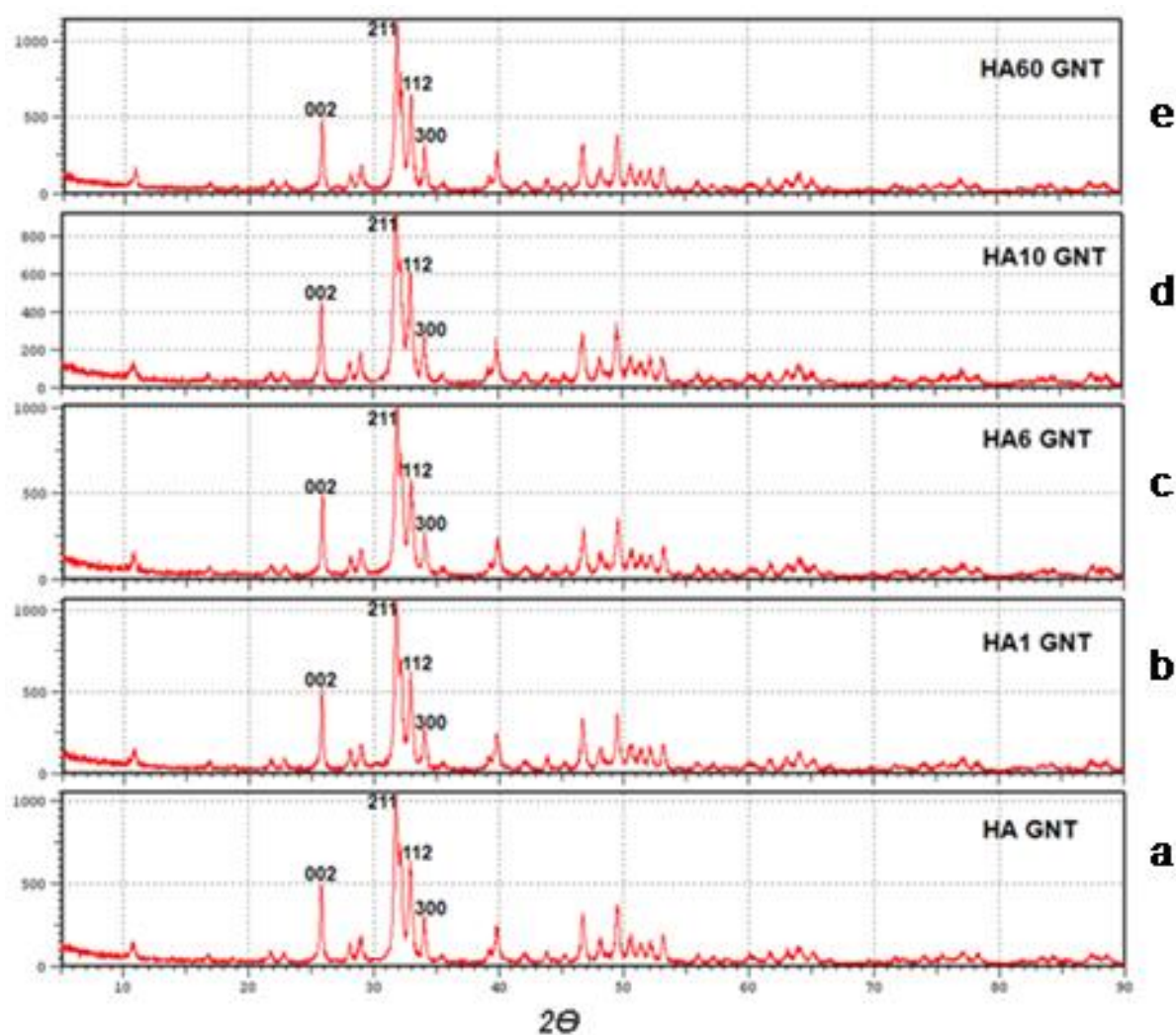


Figura 10 - Identificação dos planos através dos índices de Miller "hkl" nos difratogramas das amostras de HA obtidas por precipitação em meio aquoso (a) HAGNT e gelatinoso (b) HA1GNT; (c) HA6GNT; (d) HA10GNT e (e) HA60GNT após calcinação a 700°C com passo de varredura 2°/min entre 5 e 90°.

Portanto, através da análise de raios X com varredura rápida foi possível verificar a presença de HA como fase predominante em todas as amostras (com a adição e sem adição de gelatina; com adição e sem adição de gentamicina).

5.1.1 Refinamento pelo método de Rietveld

Para quantificação das fases presentes nas amostras sintetizadas foi realizado o refinamento dos dados de DRX pelo método de Rietveld, pois para que a HA seja usada como implante, deve conter pureza mínima de 95% (obtida por análise DRX) após o tratamento térmico como prevê a norma ASTM F1185-88⁶⁹ (*Standard specification for composition of ceramic hydroxylapatite for surgical implants*).

O refinamento através do método de Rietveld foi realizado somente para duas amostras, HAGNT e HA10, escolhidas para obtenção da análise quantitativa de fases com varredura de 5 a 130° com passo de 0,02°/min.

Na Figura 11 é possível observar que o refinamento revelou sistema com múltiplas fases para a amostra HAGNT, onde se verificou a presença de três fases estranhas à hidroxiapatita pela presença de CaCO_3 nas formas monoclinica, vaterita e calcita além da hidroxiapatita. Na amostra HA10 cujo difratograma é apresentado na Figura 12, observa-se apenas a presença de fase de hidroxiapatita.

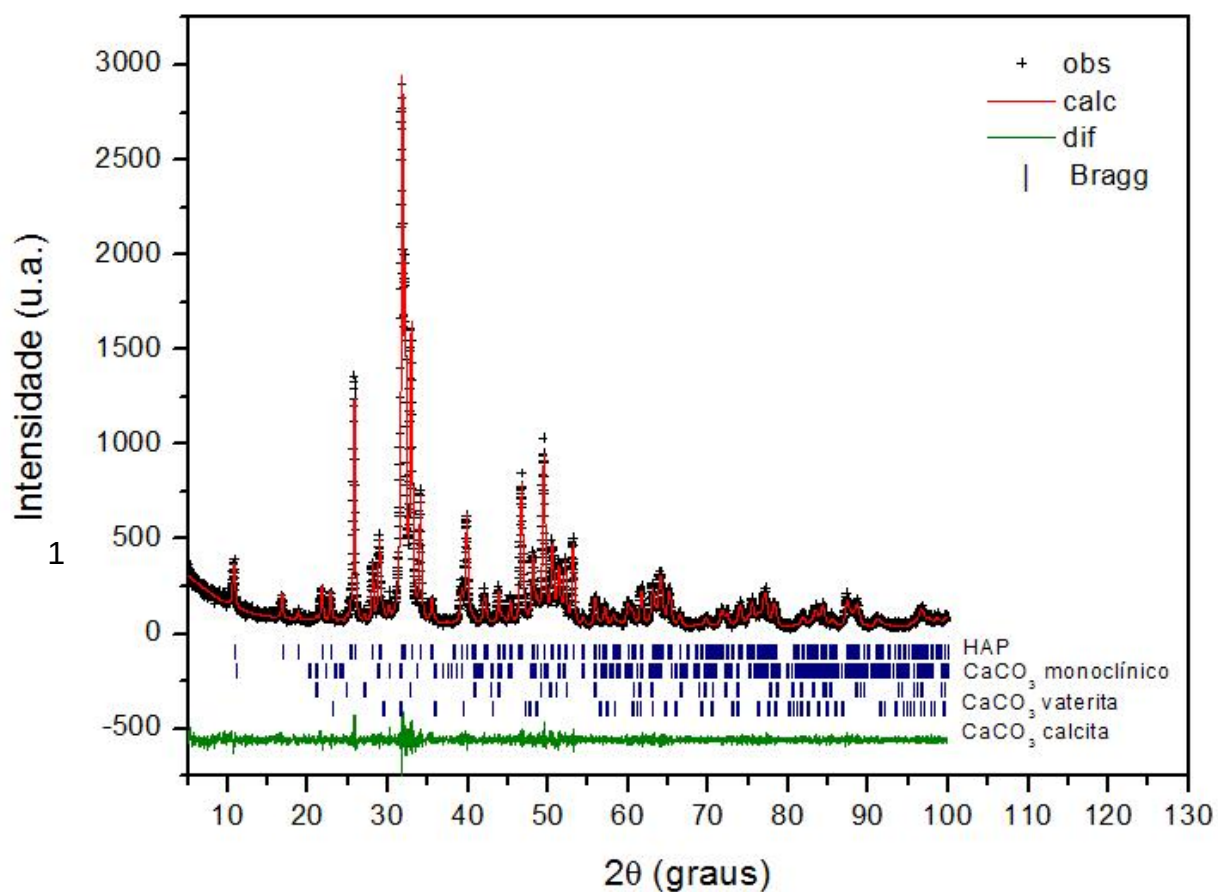


Figura 11 - Difratoograma com refinamento por Rietveld da amostra HAGNT.

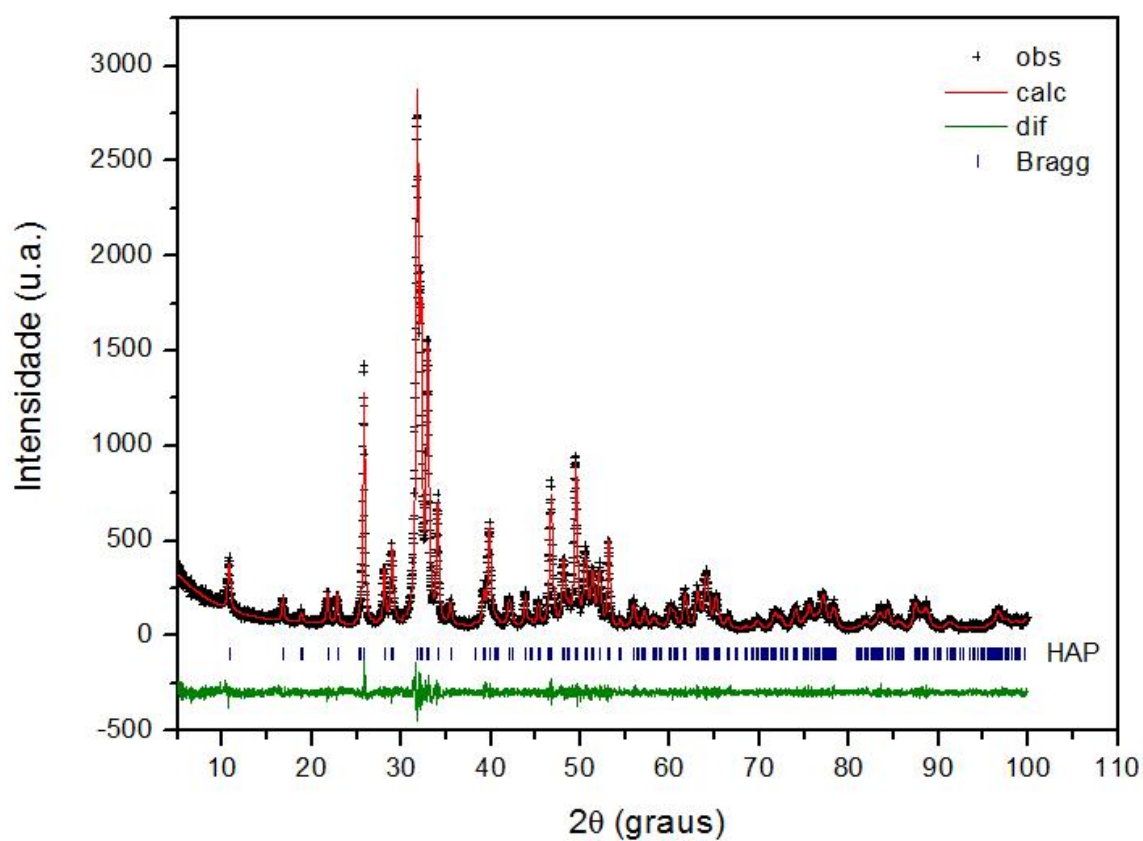


Figura 12 - Difratoograma com refinamento por Rietveld da amostra HA10.

Os indicadores de refinamento para ambas as amostras HAGNT e HA10 estão apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 traz os valores de percentual de fase para estas amostras.

Tabela 1 - Valores para os indicadores de qualidade do refinamento Rietveld para as amostras HAGNT e HA10.

AMOSTRA	R _{Bragg} (%)	R _{wp} (%)	Re	S
HAGNT	1,60	9,10	7,91	1,15
HA10	1,53	9,15	7,96	1,15

Tabela 2 - Valores de análise quantitativa de fases as amostras HAGNT e HA10.

AMOSTRA	Fases em % em massa
HAGNT	HA = 92% e CaCO ₃ = 8%*
HA10	HA = 100%

* onde 5% representa a quantidade de CaCO₃ monoclínico, 2% na forma de CaCO₃ em vaterita e 1% na forma de CaCO₃ calcita.

O carbonato de cálcio (CaCO₃) apresenta três tipos distintos de polimorfos: calcita, aragonita e vaterita. A calcita é o polimorfo termicamente mais estável à temperatura e pressão ambientes, seguido da aragonita que pode se transformar em calcita. A calcita ocorre na forma estrutural romboédrica, enquanto que a aragonita e a vaterita apresentam redes ortorrômbicas. A vaterita, assim como outras formas de carbonatos de cálcio, possui alta solubilidade em água e uma vez exposta em meio aquoso pode se converter em calcita a temperaturas próximas a 40°C e a aragonita a temperatura acima de 60°C.⁶⁸ As fases de CaCO₃ obtidas no refinamento diferem apenas quanto à posição do íon carbonato nas redes da célula unitária. Na vaterita

eles se encontram alinhados perpendicularmente ao plano *ab*, enquanto na calcita eles estão alinhados paralelamente a este plano.

A presença de múltiplas fases para a amostra HAGNT (que é preparada a partir da amostra HA pela adição de sulfato de gentamicina) pode ser explicada pela razão Ca/P que fica com um valor maior que 1,67, obtendo assim uma apatita não estequiométrica pelo excesso de cálcio no meio reacional.

Tabela 3 - Valores da razão Ca/P obtidos por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da amostras sem adição de gentamicina e com adição de gentamicina.

AMOSTRA	RAZÃO Ca/P	AMOSTRA	RAZÃO Ca/P
HA	1,72	HAGNT	1,74
HA1	1,75	HA1GNT	1,71
HA6	1,69	HA6GNT	1,69
HA10	1,68	HA10GNT	1,65
HA60	1,73	HA60GNT	1,68

Os fosfatos de cálcio podem ser obtidos através de diferentes razões Ca/P como sugere a Tabela 4 que apresenta os valores destas razões para os diferentes tipos de fosfato de cálcio. O fosfato de cálcio cristalino é também conhecido como TCP ou Whitloquita. Ele tem fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, caracterizada pela razão Ca/P de 1,5. O TCP existe em duas formas sendo um o α -TCP que é a poliforma de baixa temperatura e que se transforma na outra forma a alta temperatura (1125°C), o β -TCP.⁶²

Tabela 4 - Tipos diferentes de fosfato de cálcio obtidos por diferentes razões Ca/P^{15,63,64}

FOSFATO DE CÁLCIO	FÓRMULA QUÍMICA	RAZÃO Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico (á, á', â, ã)(TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio diidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio diidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_2\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogeno fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (á, â, ã)(CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Do conjunto de amostras apresentado na Tabela 3, três foram selecionadas para análise por espectrometria de fluorescência de raios X (FRX). A Tabela 5 mostra os valores da razão Ca/P destas amostras através da análise FRX de algumas das amostras com sulfato de gentamicina e sem a adição do mesmo.

Tabela 5 - Valores de espectrometria de fluorescência de raios X (FRX) das amostras HA (amostra sem adição de gentamicina), HA10GNT e HA60GNT (amostras com adição de gentamicina)

Amostra	Razão Ca/P
HA	1,83
HA10GNT	1,79
HA60GNT	1,85

Através da análise de difração de raios X observa-se a presença de fase majoritária de HA e que o aumento da concentração de gelatina no meio reacional e a associação com o sulfato de gentamicina não diminui a presença de fase da hidroxiapatita.

A presença de múltiplas fases relativas à presença de carbonato (CO_3^{2-}) pode ser associada a absorção do mesmo durante o processo de síntese da hidroxiapatita. Como foi observada a presença de íons Ca^{2+} em excesso pela análise de EDS e FRX (razão $\text{Ca/P} > 1,67$), estes ficam disponíveis durante o processo para interação com os íons carbonato.

A estrutura da hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, permite a substituição de todos os seus íons, Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- , mantendo sua eletroneutralidade. A substituição dos íons PO_4^{3-} e OH^- pelo íon CO_3^{2-} provocam a contração dos eixos *a* e *b* e a expansão do eixo *c* alterando a morfologia dos cristalitos pela inclusão destes íons e variação das posições atômicas, ocorre também diminuição da cristalinidade e aumento da solubilidade.

Dentre as apatitas a hidroxiapatita é aquela que possui maior estabilidade termodinâmica próxima da temperatura ambiente como cita Araújo em seu estudo, porém as variações durante o processo de síntese podem levar a formação de apatitas com elevados teores de carbonato e baixa cristalinidade ao fazer utilizar a síntese a baixas temperaturas e de acordo com o pH utilizado.^{69,70}

Durante o processo de síntese de apatitas em pH alcalino, um possível indicador da associação dos íons carbonato (CO_3^{2-}) é a sensível redução no pH para neutralidade, devido à absorção dos íons pela solução. As amostras citadas anteriormente foram obtidas à temperatura de 50°C em pH neutro (7,0) e corrigidas

para alcalino (9,0), onde não se observou após esta correção a redução do pH da solução.

Para a obtenção da amostra HA10 foi utilizada a mesma rota de síntese que aquela para obtenção da HAGNT, exceto pela adição de gelatina ao meio reacional em concentração igual a 10g.L^{-1} . A adição de gelatina poderia modificar a estrutura da hidroxiapatita pela substituição dos íons fosfato (PO_4^{3-}) e hidroxila (OH^-) pelos íons carbonato (CO_3^{2-}), o que não foi observado como indicado na Figura 11. A gelatina é basicamente formada por uma série de proteínas e aminoácidos e, portanto possuidores de grupos carboxila (R-COOH). Em pH alcalino estes grupos podem mudar para a forma de íon carboxilato (R-COO^{1-}) podendo associar-se aos íons Ca^{2+} presentes em excesso, o que não foi observado neste caso.

5.2 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA E ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA

A análise de distribuição granulométrica empregou a metodologia de difração a laser que avalia apenas aglomerados em suspensão. Os resultados são apresentados na Tabela 6 e nas Figuras 13-17.

A Tabela 6 apresenta os valores do tamanho médio da distribuição granulométrica de 10 amostras e seu tamanho médio de distribuição a 10, 50 e 90% do total de massa.

Através das análises de distribuição granulométrica foi possível observar que houve uma redução do diâmetro dos aglomerados do pó a partir das amostras de HA adicionadas de gentamicina. Isto se deve ao processamento utilizado para a adição de gentamicina.

Tabela 6 – Resumo da distribuição granulométrica das amostras de HA sintetizadas.

AMOSTRAS	Diâmetro a 10% (μm)	Diâmetro a 50% (μm)	Diâmetro a 90% (μm)	Diâmetro médio (μm)
HA	1,38	9,43	31,44	13,35
HA1	1,25	7,72	29,72	11,88
HA6	1,46	8,91	32,16	13,32
HA10	1,36	9,44	34,05	14,18
HA60	0,97	4,18	11,05	5,27
HAGNT	0,87	3,78	10,65	4,94
HA1GNT	0,81	3,80	10,91	5,02
HA6GNT	0,93	4,30	12,25	5,64
HA10GNT	0,85	3,94	11,15	5,15
HA60GNT	0,88	4,01	10,61	5,02

Os valores médios obtidos através da análise da Tabela 6 sugerem certa uniformidade entre dois grupos de amostras: as sem a adição de gentamicina e as com a adição de gentamicina. Há apenas uma amostra que não segue em padrão como as demais, a amostra HA60 que ficou muito próxima aos valores obtidos para o grupo das amostras adicionadas de gentamicina.

As Figura 13-17 mostram lado a lado o conjunto dos histogramas das amostras com o mesmo processo de preparo diferenciando pela adição de gentamicina. Nelas é possível observar pouca variação de tamanho para as amostras HA, HA1, HA6 e HA10. A amostra HA60 foi a única amostra entre as sem adição de gentamicina que teve uma variação maior de tamanho de aglomerado em relação às demais.

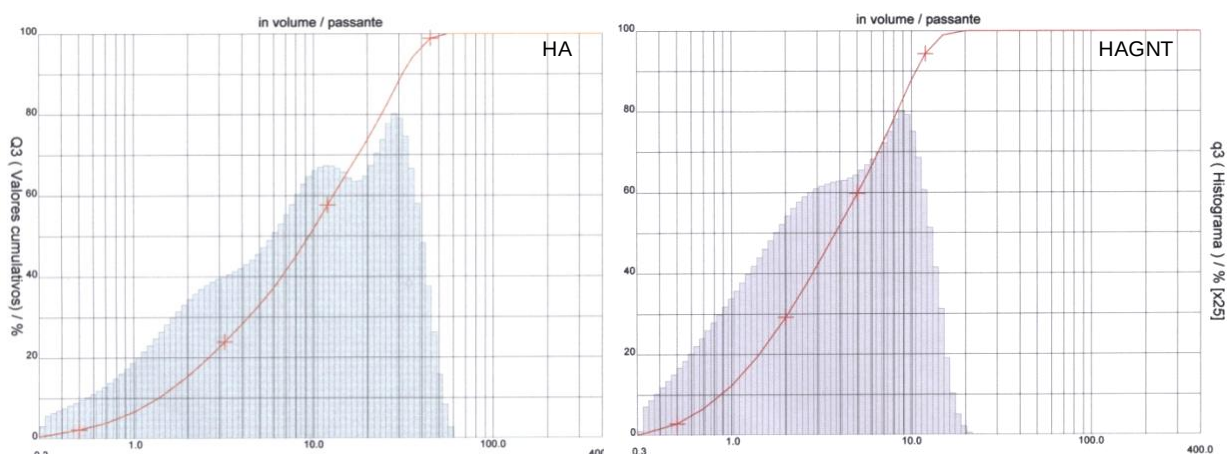


Figura 13 - Histogramas das análises granulométricas das amostras HA e HAGNT.

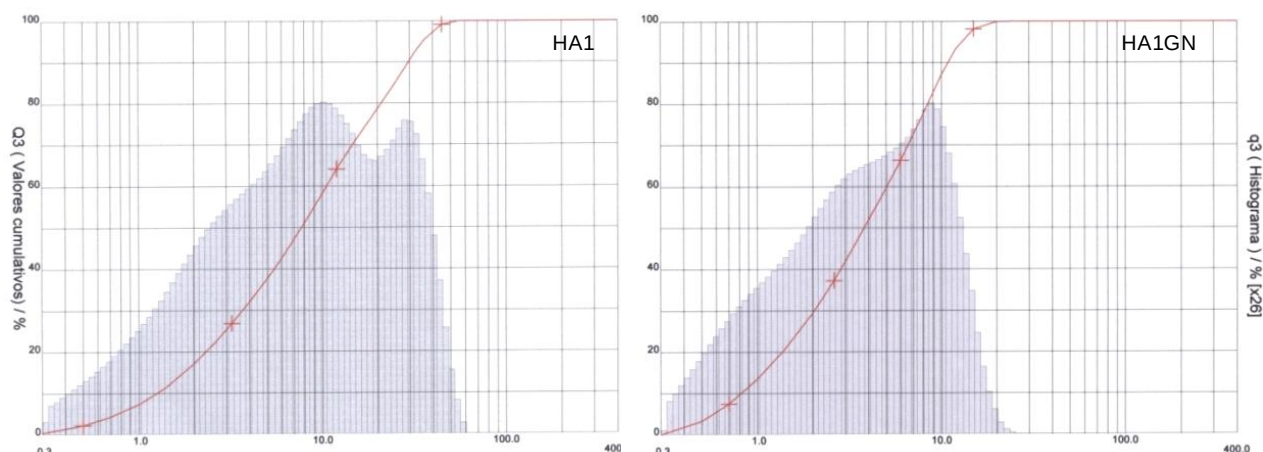


Figura 14 - Histogramas das análises granulométricas das amostras HA1 e HA1GNT.

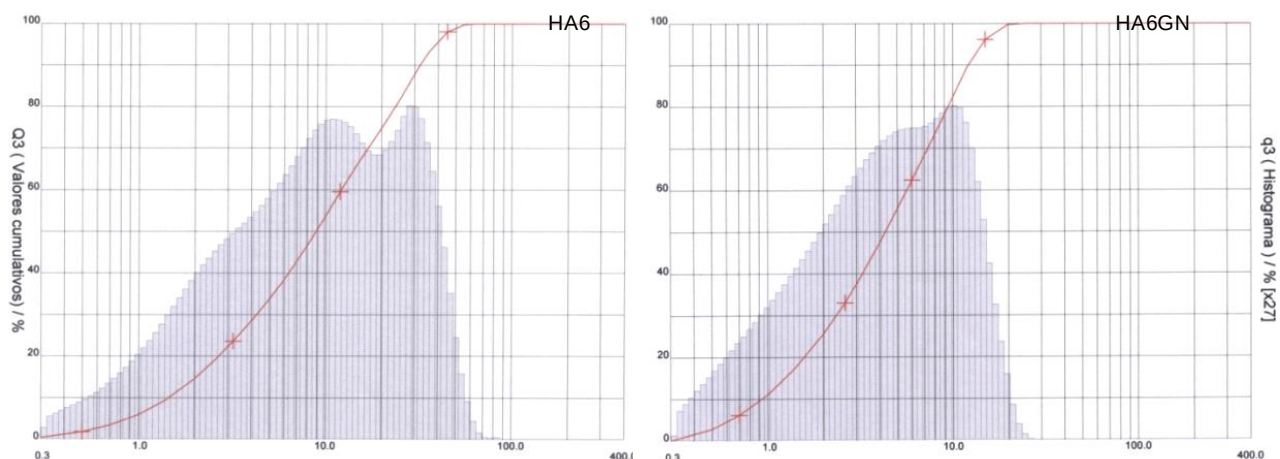


Figura 15 - Histogramas das análises granulométricas das amostras HA6 e HA6GNT.

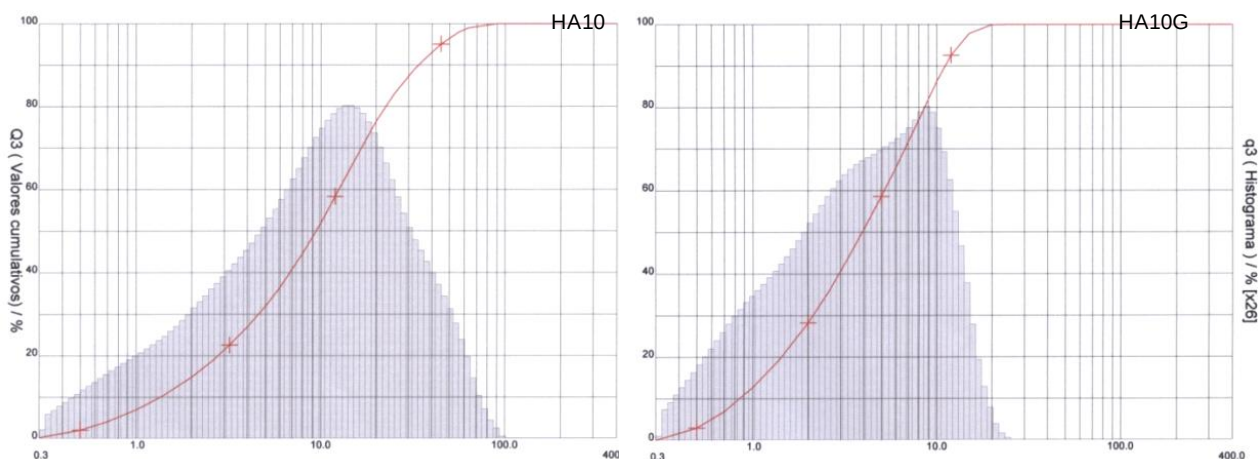


Figura 16 - Histogramas das análises granulométricas das amostras HA10 e HA10GNT.

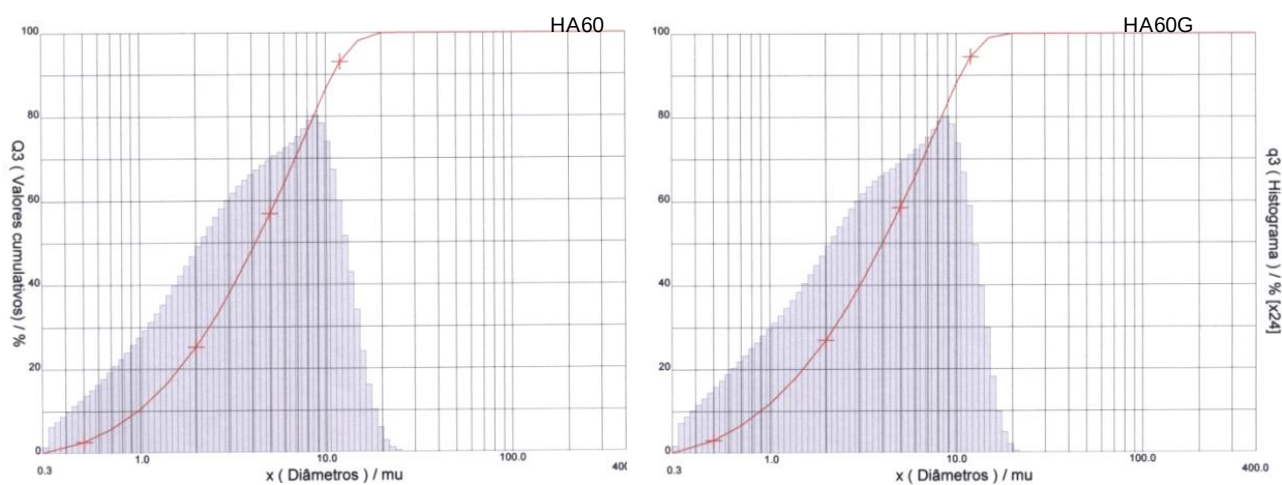


Figura 17 - Histogramas das análises granulométricas das amostras HA60 e HA60GNT.

As amostras com adição de gentamicina foram aquelas que tiveram menor distância de valores entre si para tamanho médio de partículas (Tabela 6). Tal observação se fundamenta no fato de que estas amostras foram submetidas à mistura em moinho com bolas de porcelana.

A Tabela 7 apresenta os valores da análise de área superficial específica para as amostras sem adição de gentamicina. Um maior valor obtido para a área específica também sugere que o tamanho de partículas do material seja menor o que possibilita o aumento do tamanho de aglomerado na tentativa de diminuir sua energia superficial como cita Oliveira⁵⁹ em seu estudo. Nesse caso é possível observar que houve pouca variação dos valores de área superficial específica para ambas as amostras como mostra a Tabela 6.

Tabela 7 - Valores de área superficial específica de HA variando a concentração de gelatina durante o preparo das amostras.

AMOSTRAS	HA	HA1	HA6	HA10	HA60
BET (m ² /g)	37,69	40,70	39,62	47,63	39,94

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise microscópica foi realizada com a intenção de analisar a estrutura e a superfície das partículas do material obtido. As Figuras 18-22 mostram as micrografias comparadas na mesma ampliação para as amostras sem adição e com a adição de gentamicina para uma mesma quantidade de gelatina adicionada no preparo destas amostras (ou ausência de gelatina).

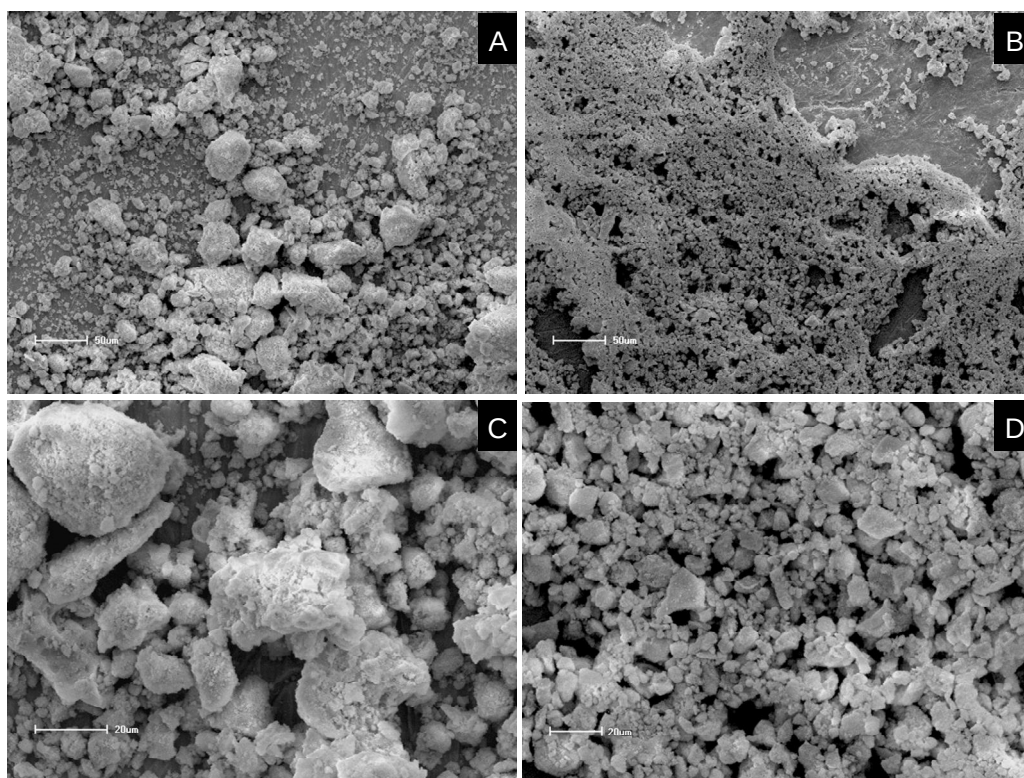


Figura 18 - Micrografias das amostras HA (A) e HAGNT (B) com aumento de 200x e HA (C) e HAGNT (D) com aumento de 700x.

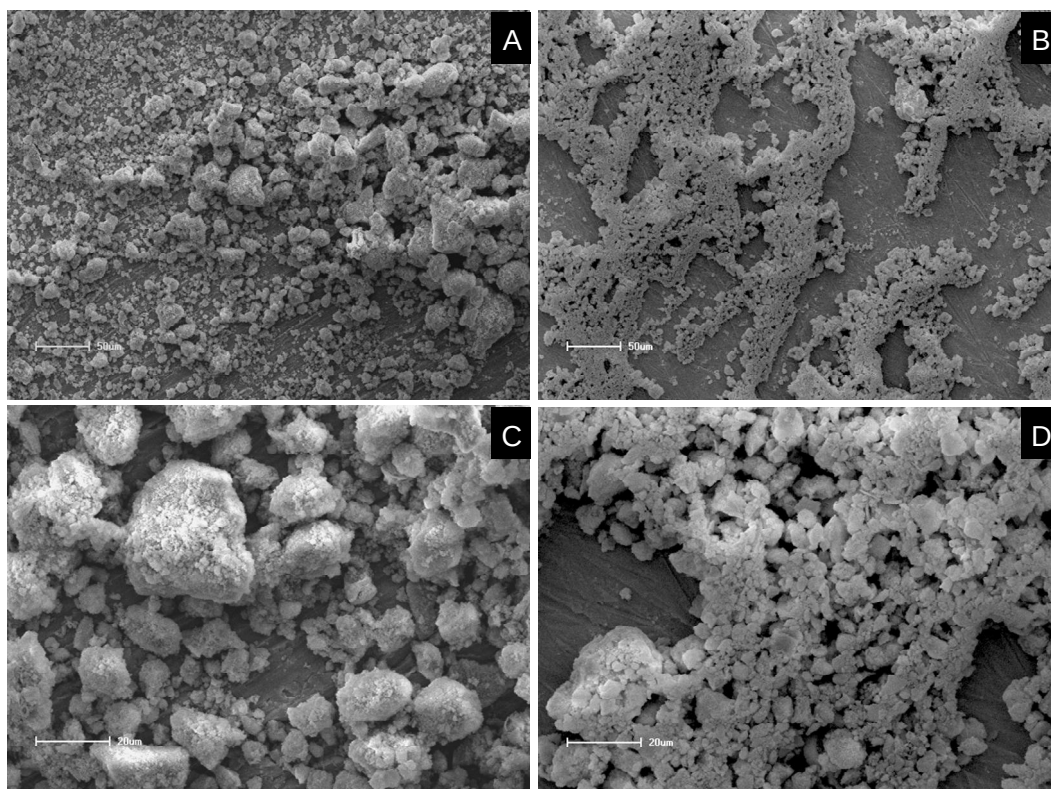


Figura 19 - Micrografias das amostras HA1 (A) e HA1GNT (B) com aumento de 200x e HA1 (C) e HA1GNT (D) com aumento de 700x.

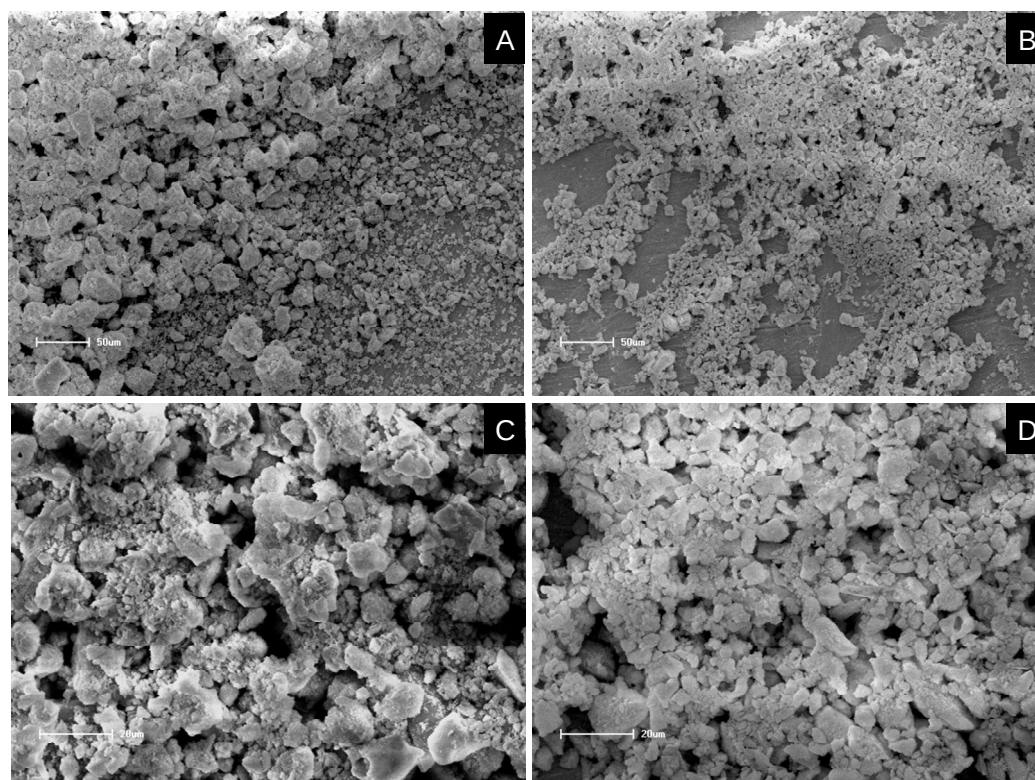


Figura 20 - Micrografias das amostras HA6 (A) e HA6PGNT (B) com aumento de 200x e HA6 (C) e HA6PGNT (D) com aumento de 700x.

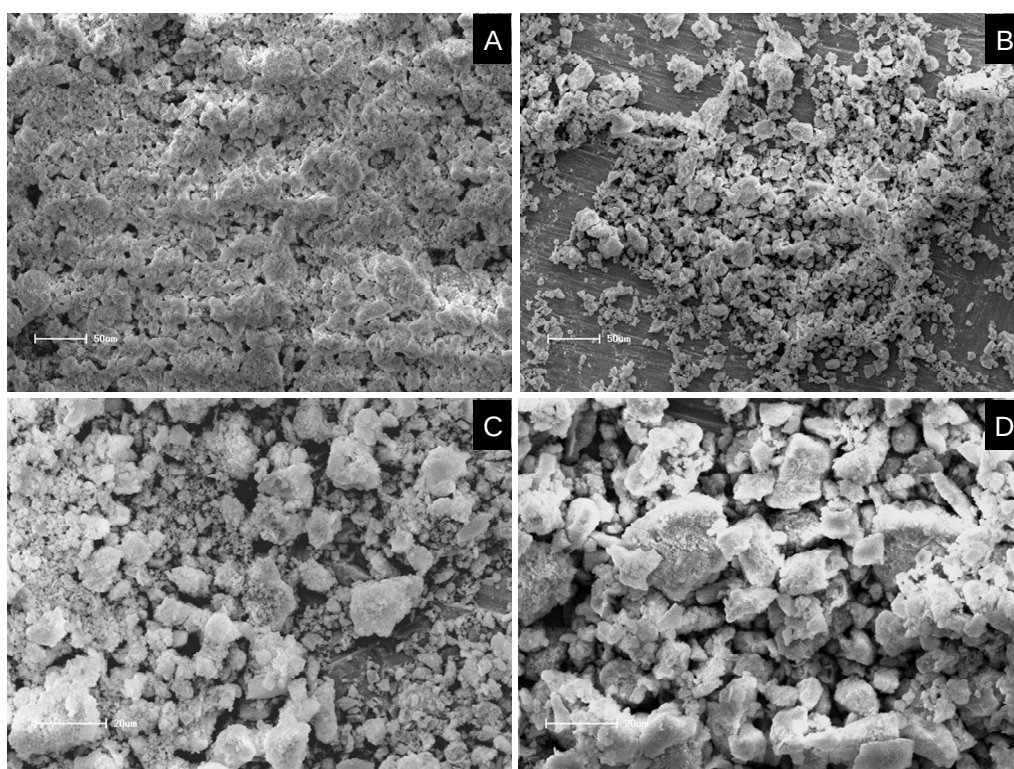


Figura 21 - Micrografias das amostras HA10 (A) e HA10GNT (B) com aumento de 200x e HA10 (C) e HA10GNT (D) com aumento de 700x.

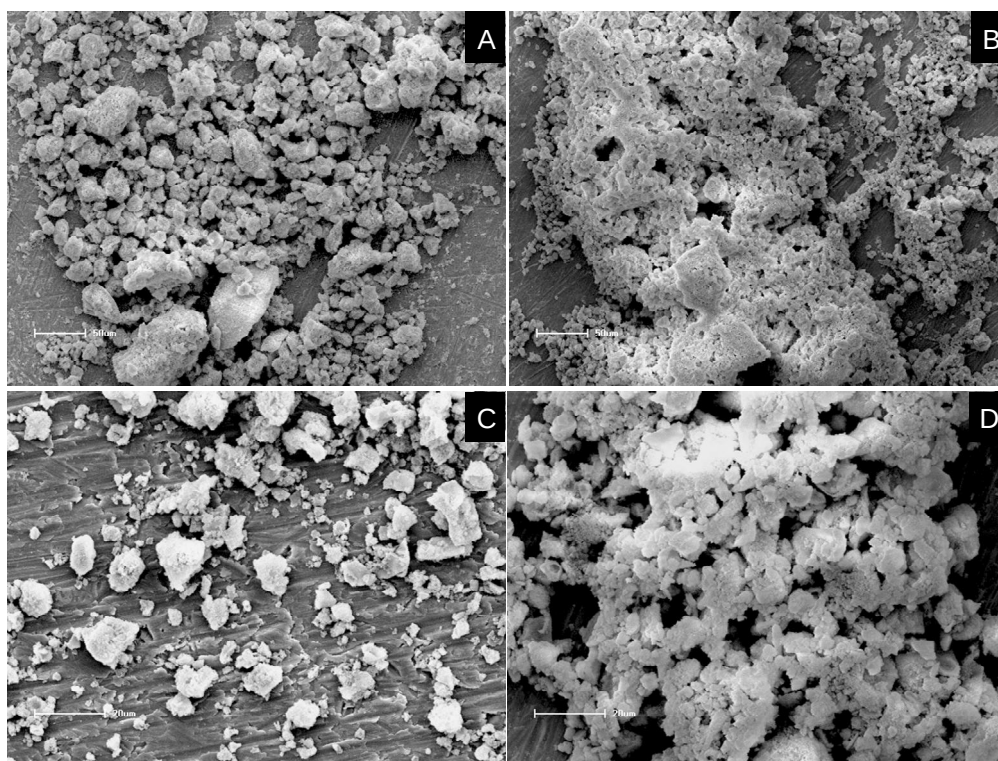


Figura 22 - Micrografias das amostras HA60 (A) e HA60GNT (B) com aumento de 200x e HA60 (C) e HA60GNT (D) com aumento de 700x.

No aspecto morfológico geral, as hidroxiapatitas apresentaram-se como materiais com tamanho pequeno de grão e com boa distribuição média de partícula, como observado pelos valores das análises de granulometria e visualizadas através das micrografias de varredura.⁷¹

É possível perceber através da análise das micrografias “A” (aumento de 200x) das amostras HA, HA1, HA6 e HA10 certa uniformidade em seu tamanho de partícula e que pode ser comprovado pela análise granulométrica (Tabela 6) e área superficial específica (Tabela 7). No caso da amostra HA60 para a mesma ampliação, nota-se leve aumento no tamanho de partícula e que também se deve ao seu baixo valor para a análise granulométrica, igual a 5,27 μ m de tamanho médio, e 41,5 m²/g para área superficial específica.

Considerando apenas as amostras “B” (aumento 200x) em sequência (HAGNT, HA1GNT, HA6GNT, HA10GNT e HA60GNT, respectivamente) fica mais evidente a uniformidade de tamanho de partícula, uma vez que todas passaram pelo mesmo processo de moagem durante a impregnação com gentamicina a 1% em massa. Tais resultados também podem ser evidenciados através da análise de distribuição granulométrica que tem seus valores apresentados na Tabela 6.

Nas micrografias com aumento de 700x é possível evidenciar uma maior uniformidade nos grânulos das hidroxiapatitas impregnadas com gentamicina. Nota-se que estas amostras possuem forma mais arredondada e grânulos menores em relação ao material sem a adição de gentamicina, justificado este fato também pelo processamento citado anteriormente.

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Assim como a análise MEV, a microscopia eletrônica de transmissão revela aspectos morfológicos característicos do material e informações relativas ao tamanho de partículas. As Figuras 23-25 a seguir apresentam o conjunto de amostras sem a adição de gentamicina e com a adição desse material com aumento de 120 e 250 mil vezes.

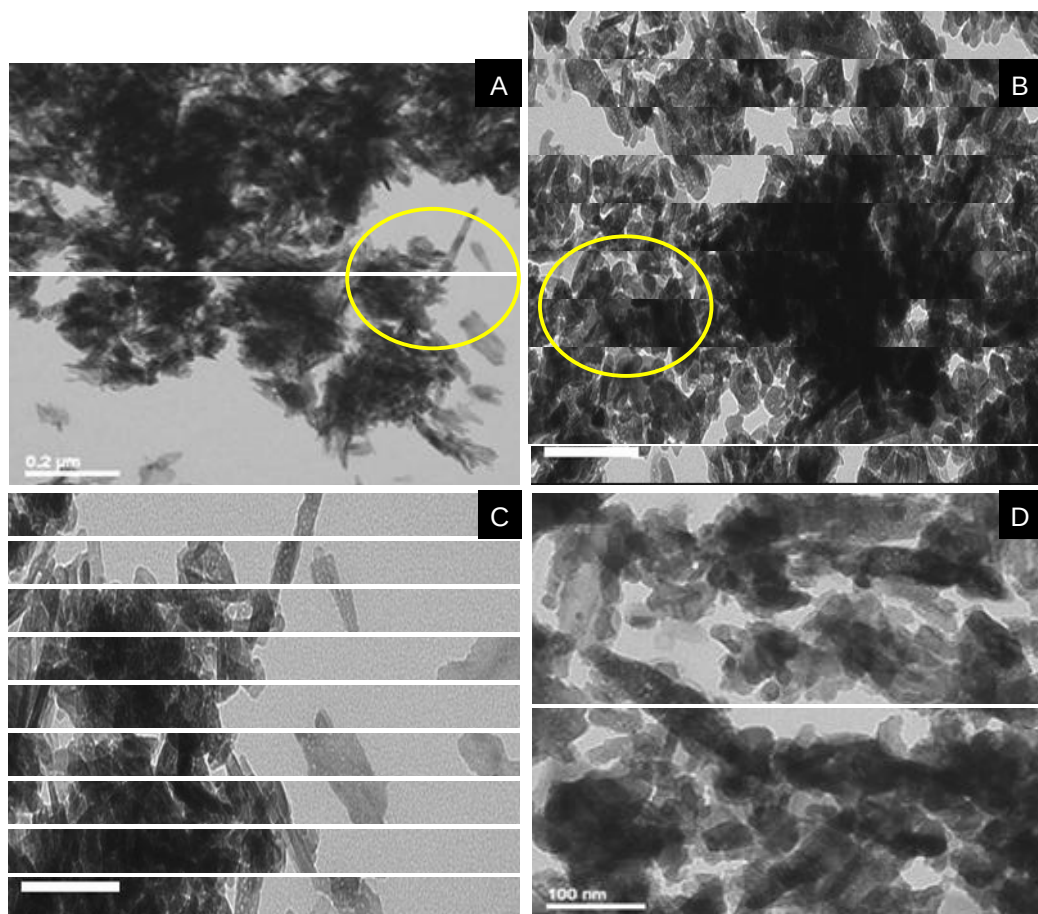


Figura 23 - Micrografias de transmissão das amostras HA (A) e HAGNT (B) com aumento de 120'000x e HA P(C) e HAGNT (D) com aumento de 250'000x (região destacada) a 80kV.

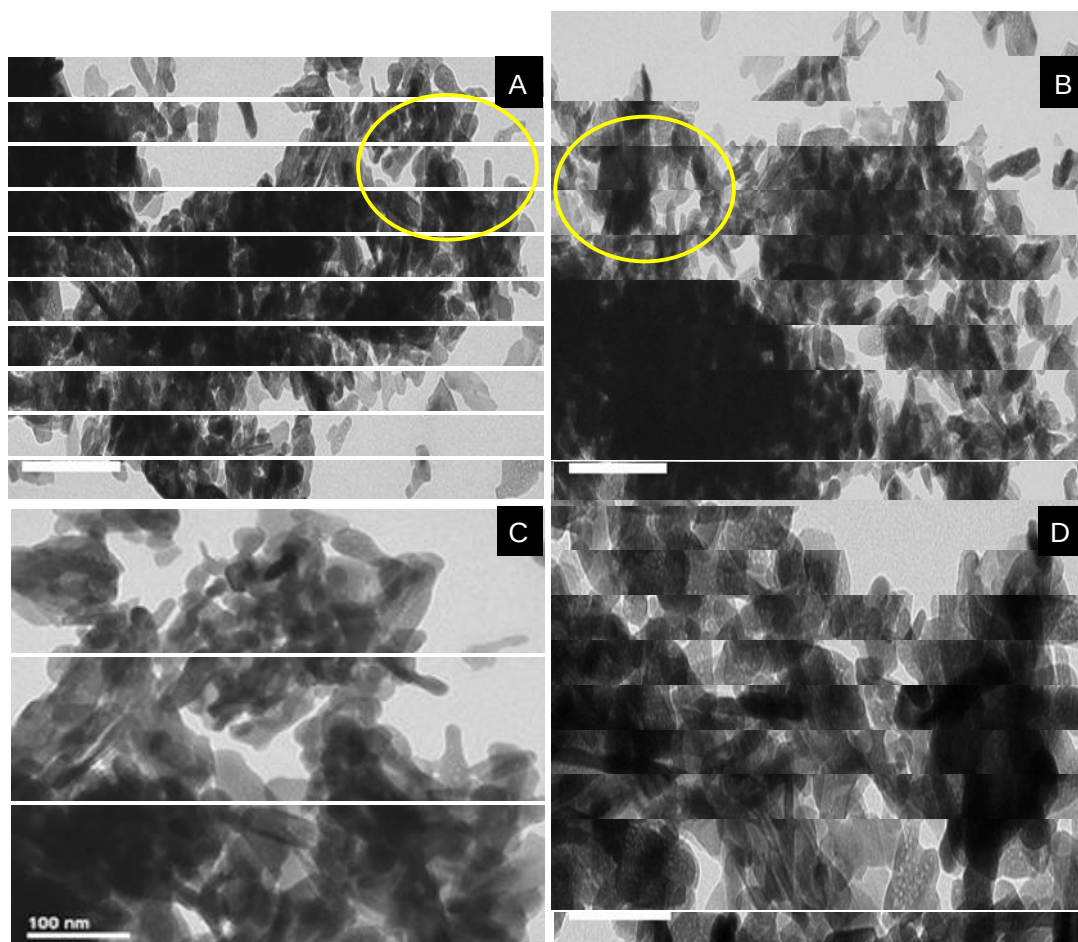


Figura 24 - Micrografias de transmissão das amostras HA6 (A) e HA6GNT (B) com aumento de 120'000x e HA6 (C) e HA6GNT (D) com aumento de 250'000x (região destacada) a 80kV.

No conjunto de micrografias (MET) apresentado nas Figuras 18 e 19 observam-se nas micrografias A e B de ambas as amostras (sem adição e com adição de gentamicina, respectivamente, no aumento de 120mil vezes) diferença no tamanho do cristalito. A região destacada com o círculo amarelo é a região que sofre aumento para 250 mil vezes.

A presença da gentamicina nas amostras provou não alterar a estrutura da HA, observando apenas diferença no tamanho de aglomerado devido à moagem durante a preparação do material. A forma acicular (agulhas) característica da HA é observada ainda mais evidentemente quando se observa o aumento de 250 mil vezes. No comparativo entre as amostras A e C ou entre B e D (mesma amostras

com aumentos de 120 e 250 mil vezes, respectivamente), nota-se a presença de aglomerados da ordem de 100 nm e cristaltitos de 50 nm.⁵⁰

As amostras com a adição de gelatina no seu preparo possuem formato menos irregular, podendo observar um contorno menos acicular (forma pontiaguda) que as amostras obtidas sem a adição de gelatina como é possível observar nas micrografias A e B da Figura 25, onde a amostra foi obtida com concentração de gelatina igual a 10 g.L^{-1} , evidenciado a uniformidade do cristalito e aglomerados no detalhe do aumento.

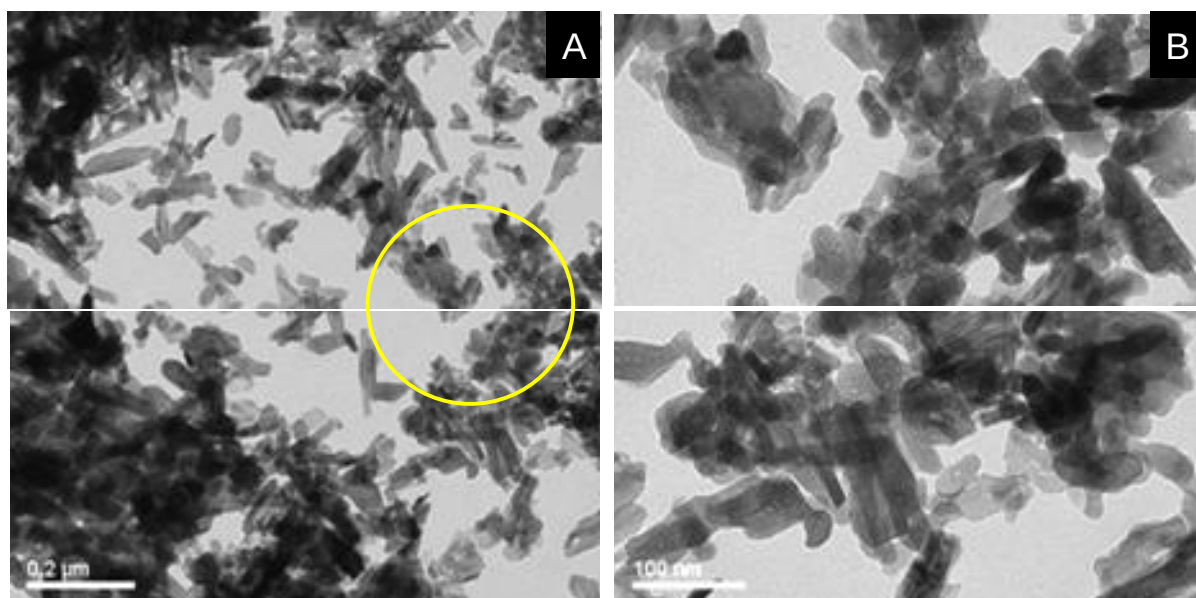


Figura 25 - Micrografias de transmissão das amostras HA10 (A) com aumento de 120'000x e (B) com aumento de 250'000x (região destacada) a 80kV.

5.5 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER (IVTF)

A análise de infravermelho possui fundamental importância neste trabalho devido à capacidade de identificação de grupos característicos do material obtido, como é o caso da presença dos grupos fosfato na HA e de grupos orgânicos, como os grupos amino (N-H) existentes na gelatina e no antibiótico utilizado, o sulfato de gentamicina.

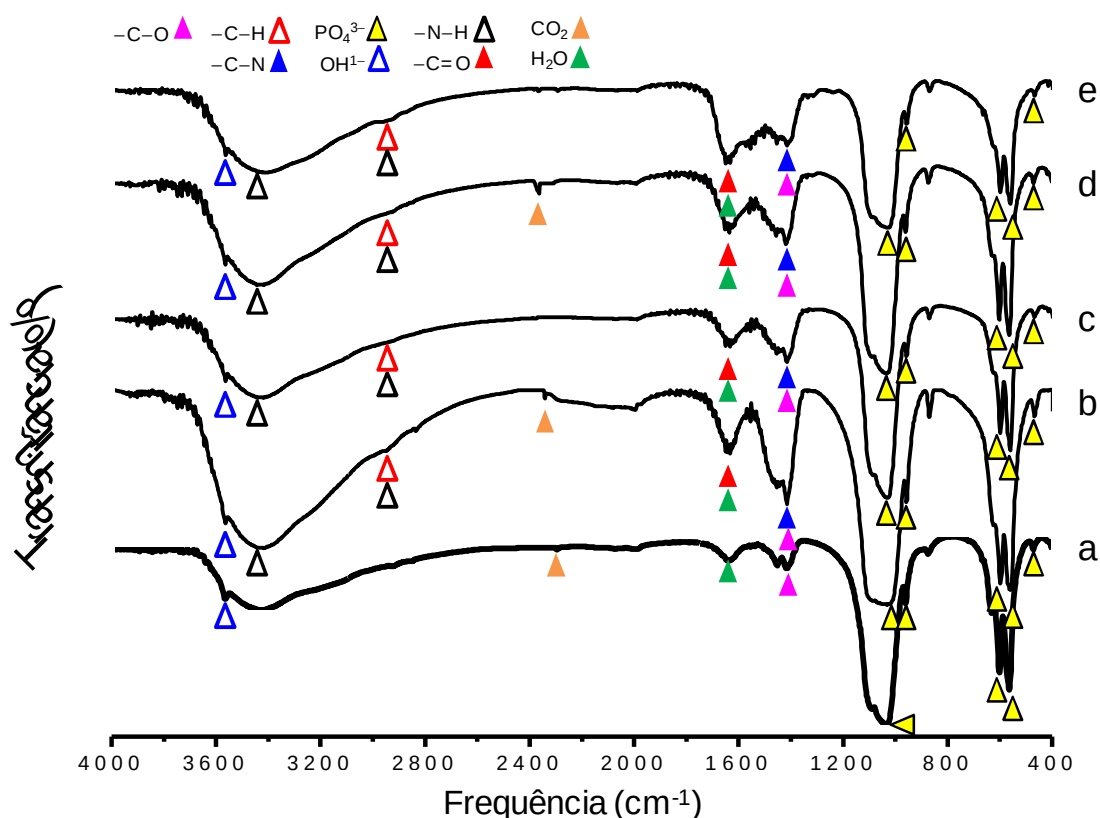


Figura 26 - Espectro IVTF das amostras de hidroxiapatita sem calcinação (a) HA, (b) HA1, (c) HA6P, (d) HA10 e (e) HA60 obtidas em pastilha de KBr.

A Figura 26 apresenta as amostras de HA antes da calcinação sem adição e com adição de gelatina em diferentes concentrações. Um espectro característico da HA deve possuir um pico bem definido em torno de 630 cm^{-1} que está relacionado

com as ligações PO_4^{3-} em torno de 570 cm^{-1} com contribuição da ligação $-\text{OH}$ do grupo apatita em 630 cm^{-1} .^{23,76-80}

Através da análise da Figura 28 é possível destacar a presença do estiramento das ligações $\text{P}-\text{O}$ dos grupos fosfato (PO_4^{3-}) referentes aos picos em 1053 , 960 , 634 e 566 cm^{-1} em ambas as amostras, assim como o estiramento de ligação do íon hidróxido (OH^-) em 3565 cm^{-1} característico da HA. O pico observado em 2361 cm^{-1} para as amostras HA, HA1 e HA10 pode ser atribuído ao CO_2 absorvido do meio ambiente.^{77,78} Em 1420 cm^{-1} observa-se o estiramento da ligação $-\text{C}-\text{O}$ dos íons carbonato. Nas amostras com a presença de gelatina observa-se aumento da intensidade do pico na região de 1420 cm^{-1} devido à presença dos grupos $-\text{C}-\text{N}$ de amida e que encobrem o pico do estiramento da ligação $-\text{C}-\text{O}$ dos íons carbonato. O valor observado em 1635 cm^{-1} é atribuído à deformação angular da água e que fica encoberto pelo aumento da intensidade do pico na mesma região e valor referente à deformação axial do grupo $-\text{C}=\text{O}$ de amidas e do grupo carboxilato ($\text{R}-\text{COO}^{1-}$). Na amostras com adição de gelatina ainda é possível observar a presença de grupos amino ($-\text{N}-\text{H}$) que correspondem aos valores de 3447 e 2940 cm^{-1} . O valor de 3447 cm^{-1} aparece sobreposto aos íons hidróxido na mesma região. A região de 2940 cm^{-1} além de ser característica de grupos amino oriundos de aminoácidos da gelatina, também aparece sobreposta a outro tipo de deformação para as amostras com a adição de gelatina, este valor também faz referência ao grupo $-\text{C}-\text{H}$ característico de compostos orgânicos e bastante comuns na gelatina devido a diferentes radicais possíveis nas cadeias laterais dos seus aminoácidos constituintes.^{57,59,77}

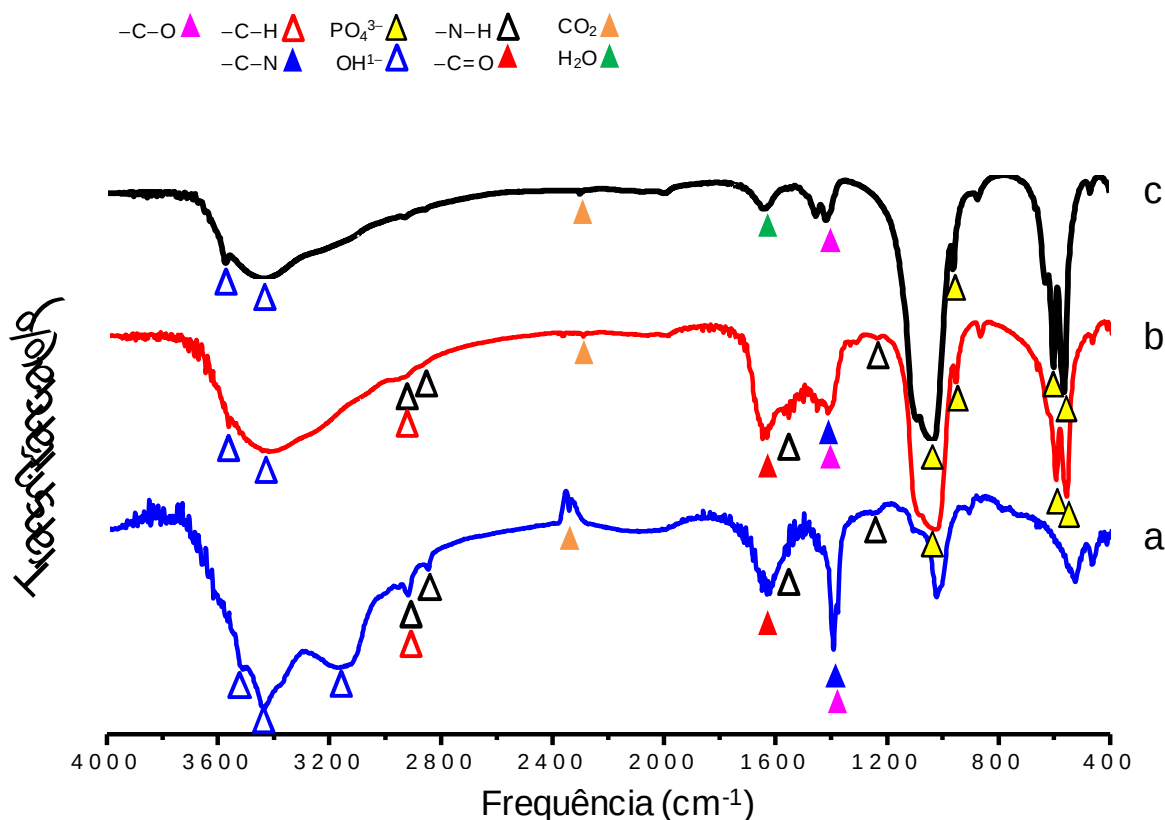


Figura 27 - Espectro IVTF das amostras (a) gelatina pura, (b) HA + gelatina e (c) HA obtidas em pastilha de KBr.

O espectro apresentado na pela Figura 27 faz referência a um comparativo da presença de grupos característicos entre as amostras de hidroxiapatita com adição de gelatina, de gelatina pura e de hidroxiapatita sem adição de gelatina, sendo que estas amostras de hidroxiapatita não foram submetidas ao processo de calcinação. É possível através do espectro da gelatina reconhecer nos picos 2940, 2850 (característico de aminoácidos), 1550 e 1250 cm^{-1} os grupos amino ($-\text{N}-\text{H}$), bem como os valores dos estiramentos dos grupos $-\text{C}=\text{O}$ de amidas e do grupo carboxilato ($\text{R}-\text{COO}^{1-}$) e $-\text{C}-\text{H}$, que aparecem em 1635 e 2940 cm^{-1} , respectivamente. O estiramento do grupo $-\text{C}-\text{H}$ aparece sobreposto aos grupos amino citados anteriormente. O conjunto dos picos dos grupos hidroxila e fosfato que aparecem no espectro caracterizam a fase de hidroxiapatita.

Na Figura 28 é possível observar as amostras de hidroxiapatita que foram submetidas a tratamento térmico por calcinação à 700°C. Nela é possível observar o

mesmo conjunto de picos característicos da HA (fosfato e hidróxido) mais intensos devido à calcinação tornar mais estável a fase de HA. Depois do tratamento térmico é possível observar igualmente o aumento da intensidade do pico em 1635 cm^{-1} referente ao grupamento C=O dos íons carbonato (CO_3^{2-}). O aumento de sua intensidade pode ser sugerida pela saída da água adsorvida provocada pelo processo de calcinação e que possui valor de deformação sobreposto ao íon carbonato. Também é possível observar um aumento na intensidade do pico em 1420 cm^{-1} que se refere ao estiramento da ligação C-O (do íon carbonato) em relação às amostras sem calcinação devido ao processo de tratamento térmico. Observa-se que quando ocorre gradual aumento da quantidade de gelatina a intensidade deste pico reduz possibilitando uma amostra de HA livre de fases derivadas de carbonato (apatitas carbonatadas).⁵⁷

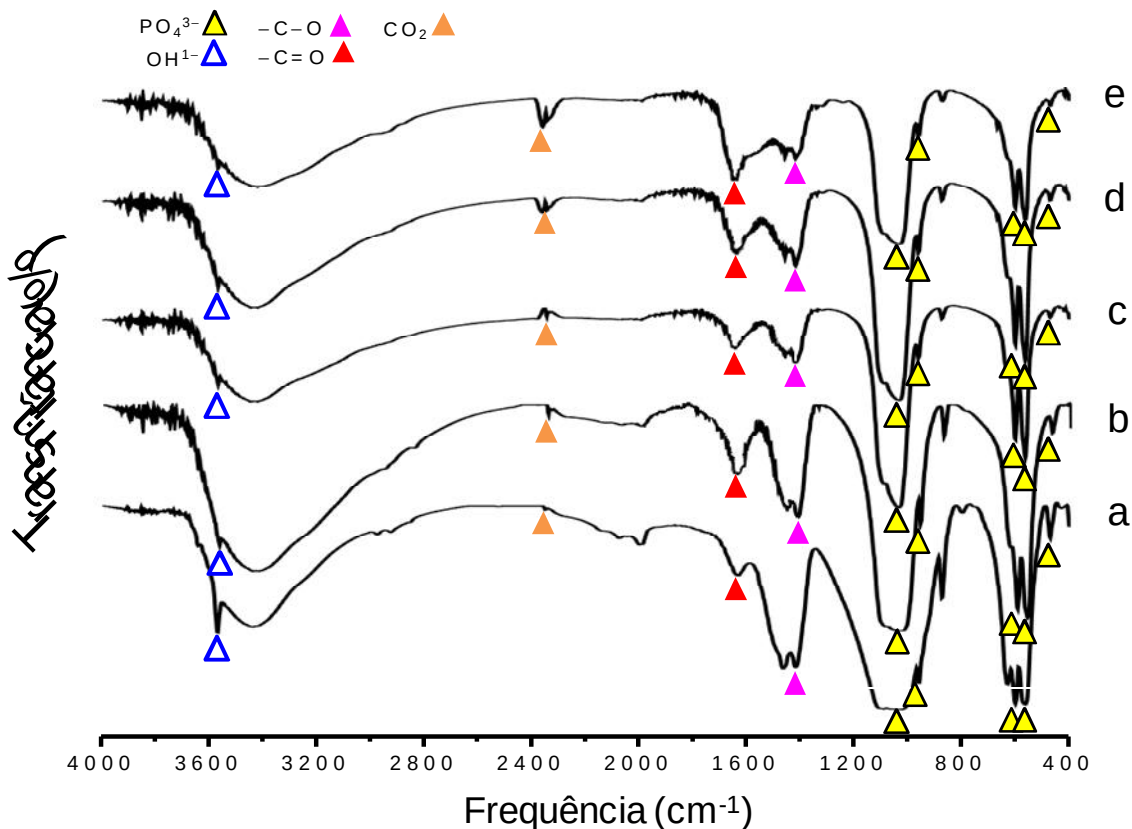


Figura 28 - Espectro IVTF das amostras de hidroxiapatita após calcinação a 700°C (a) HA, (b) HA1, (c) HA6, (d) HA10 e (e) HA60 obtidas em pastilha de KBr.

Às amostras de HA obtidas por processo de precipitação utilizando meio reacional aquoso e gelatinoso seguidas de calcinação foi adicionada uma quantidade igual a 1% em massa do antibiótico sulfato de gentamicina. A Figura 29 apresenta um comparativo entre gentamicina pura, uma amostra de HA com adição de gentamicina e da HA pura, onde é possível evidenciar a presença dos grupos amino ($-N-H$) na região de 3000 e 2150 cm^{-1} e éter ($C-O-C$) da gentamicina sobreposto ao espectro da hidroxiapatita em 1300 cm^{-1} .

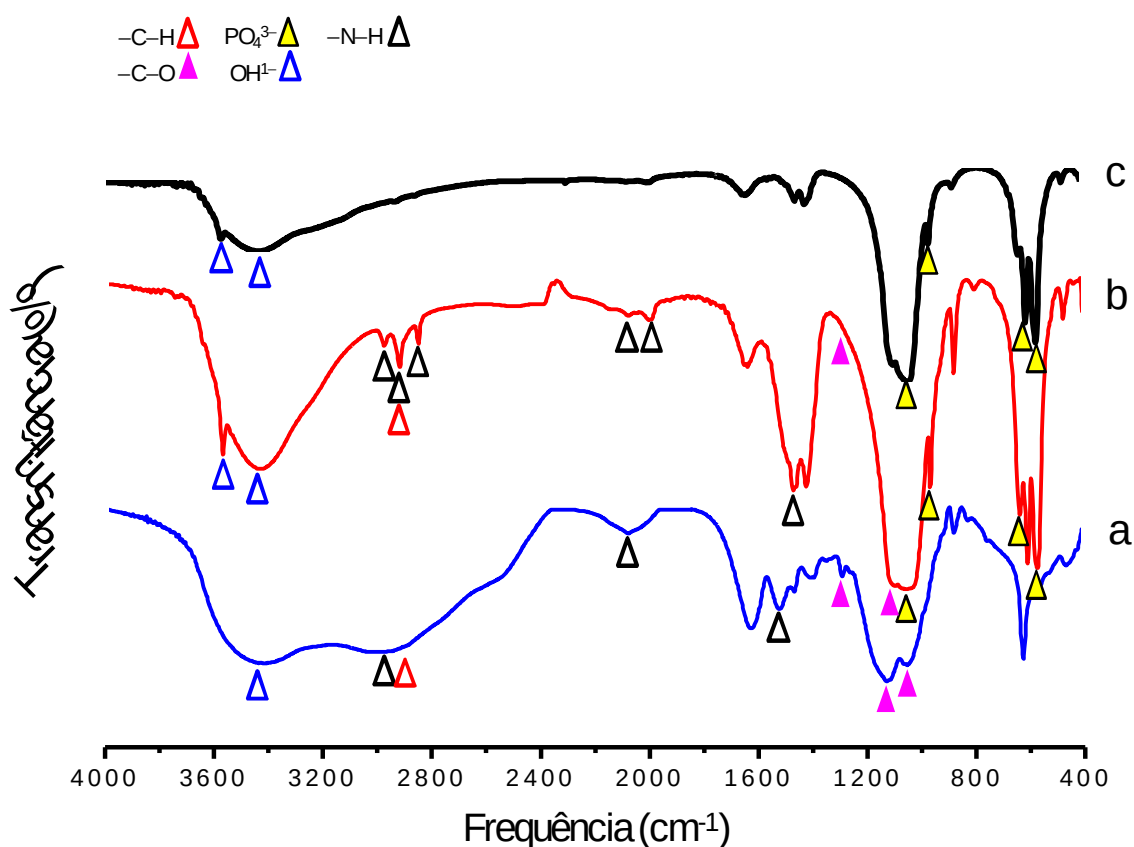


Figura 29 - Espectro IVTF das amostras (a) sulfato de gentamicina puro, (b) HA + sulfato de gentamicina puro e (c) HA obtidas em pastilha de KBr.

Tabela 8 – Bandas de IV observadas nos espectros das amostras de HA, gelatina e gentamicina.

Grupos Amostra	OH ⁻	-N-H	-C-H	CO ₂	H ₂ O	CO ₃ ²⁻	-C-O	-C-N	PO ₄ ³⁻
HA	v 3565	----	----	2360	v 1635	1635	v 1420	----	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA1	v 3565	δ 3447 δ 2940	δ 2940	2360	v 1635	1635	v 1420	v 1420	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA6	v 3565	δ 3447 δ 2940	δ 2940	----	v 1635	1635	v 1420	v 1420	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA10	v 3565	δ 3447 δ 2940	δ 2940	2360	v 1635	1635	v 1420	v 1420	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA60	v 3565	δ 3447 δ 2940	δ 2940	----	v 1635	1635	v 1420	v 1420	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HÁ (700°C)	v 3565	----	----	2360	v 1635	1635	v 1420	----	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA1 (700°C)	v 3565	----	----	2360	v 1635	1635	v 1420	----	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA6 (700°C)	v 3565	----	----	2360	v 1635	1635	v 1420	----	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA10 (700°C)	v 3565	----	----	2360	v 1635	1635	v 1420	----	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA60 (700°C)	v 3565	----	----	2360	v 1635	1635	v 1420	----	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HAGNT	v 3565	δ 2977 δ 2917 δ 2849	δ 2917	2360	v 1635	1635	v 1420	Sobreposto a OH ⁻	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA1GNT	v 3565	δ 2917 δ 2849	δ 2917	2360	v 1635	1635	v 1420	Sobreposto a OH ⁻	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA6GNT	v 3565	δ 2977 δ 2917 δ 2849	δ 2917	2360	v 1635	1635	v 1420	Sobreposto a OH ⁻	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA10GNT	v 3565	δ 2977 δ 2917 δ 2849	δ 2917	2360	v 1635	1635	v 1420	Sobreposto a OH ⁻	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
HA60GNT	v 3565	δ 2977 δ 2917 δ 2849	δ 2917	2360	v 1635	1635	v 1420	Sobreposto a OH ⁻	v 1053 δ 960 δ 634 δ 566
Gelatina	v 3550 v 3450 v 3100	δ 2940 δ 2850 δ 1550 δ 1250	δ 2940	2360	v 1635	1635	3000 2915	Sobreposto a OH ⁻	----
GNT	v 3450	δ 3000 δ 2915	δ 2917	----	v 1635		δ 1300	Sobreposto a OH ⁻	----

No espectro da amostra de gentamicina pura é possível observar a presença de íons hidróxido na região $\cong 3500\text{ cm}^{-1}$ e que são observados na mesma região das amostras HA e HA+gentamicina. Os grupos amino ($-\text{N}-\text{H}$) na estrutura da gentamicina se apresentam como deformação axial do íon amônio, devido à existência de sal de amina II (próprio do sulfato na gentamicina) em comprimento de onda próximo a 3000 cm^{-1} . Este grupo está presente na forma de bandas de combinação dos sais de amina em 2080 cm^{-1} e em 1515 cm^{-1} como deformação angular de aminas primária e secundária. Na amostra HA+gentamicina encontramos os picos correspondentes aos grupos amino em 2977 , 2917 e 2849 cm^{-1} , sendo o pico 2917 cm^{-1} sobreposto com o grupo $-\text{C}-\text{H}$ observado igualmente na amostra de gentamicina pura. Na amostra de gentamicina ainda são observadas as deformações axiais assimétricas e simétricas do grupo $\text{C}-\text{O}$ de éter correspondentes aos valores 1284 , 1121 e 1044 cm^{-1} e que são observadas na amostra HA com incorporação de gentamicina (HA+gentamicina) nas mesmas regiões, exceto por 1284 cm^{-1} deslocado e sobreposto pelo pico de forte intensidade de íon fosfato. Os íons fosfato característicos das amostras de HA são observados em 1053 , 960 , 634 e 566 cm^{-1} . As demais amostras de HA com a adição de gentamicina foram igualmente submetidas à análise de infravermelho para confirmação da presença do material associado e que pode ser observado na Figura 30 onde é importante e possível evidenciar nas amostras a região dos picos dos grupos amino em 2977 , 2917 e 2849 cm^{-1} com o pico 2917 cm^{-1} sobreposto ao grupo $-\text{C}-\text{H}$.^{4,57,77}

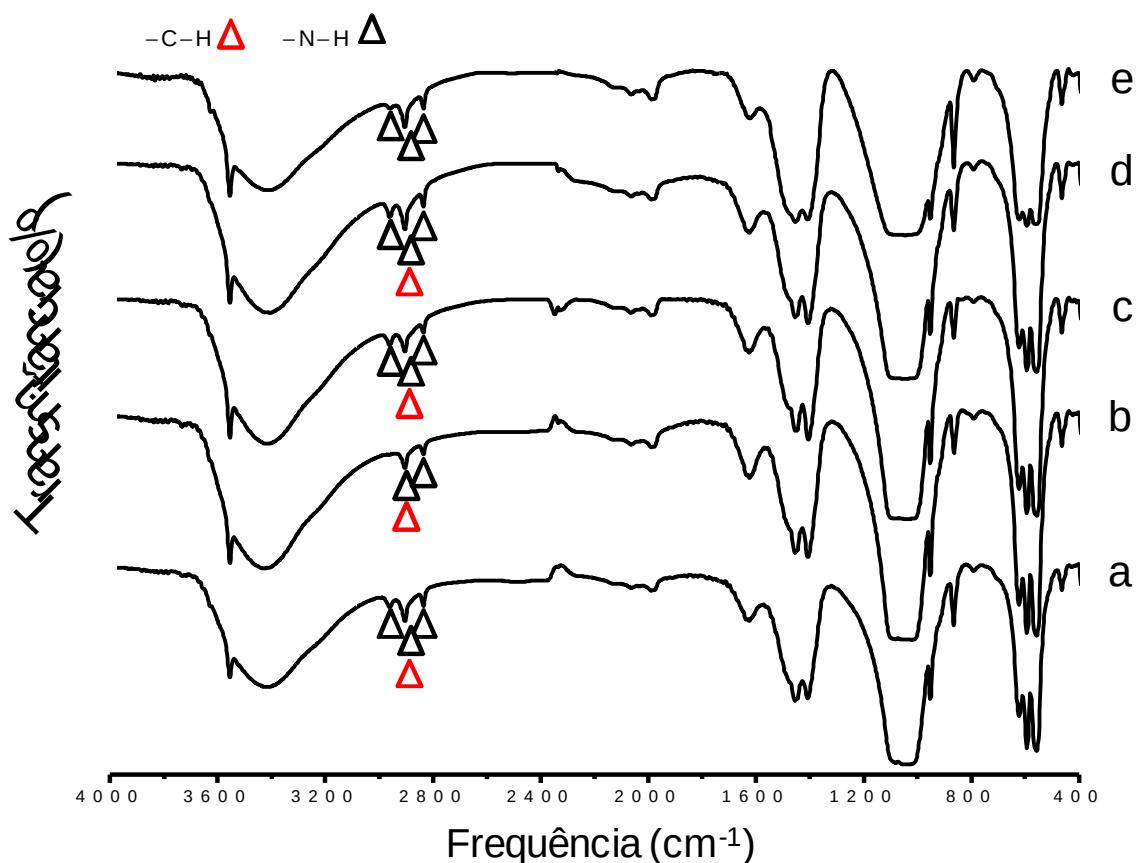


Figura 30 - Espectro IVTF das amostras de hidroxiapatita com adição de 1% em massa do antibiótico (a) HAGNT, (b) HA1GNT, (c) HA6GNT, (d) HA10GNT e (e) HA60GNT obtidas em pastilha de KBr.

Através da análise de infravermelho foi possível evidenciar a presença da gelatina adicionada durante o processo, bem como a adição de gentamicina e a caracterização da fase de hidroxiapatita pelos grupos característicos. A gentamicina provou estar associada ao material e a gelatina possibilitou a formação de HA livre (ou com mínima quantidade) de fase de carbonato.

5.6 ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica foi realizada até a temperatura de 1300°C com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N₂. As Figuras 31-33 mostram as curvas TG das amostras HA, HA1 e HA10 onde se observa que a perda de massa total foi de 8,1% para amostra HA, 10,0% para a amostra HA1 e 11,8% para a amostra HA10, portanto observou-se um aumento na perda de massa com o aumento da concentração de gelatina.

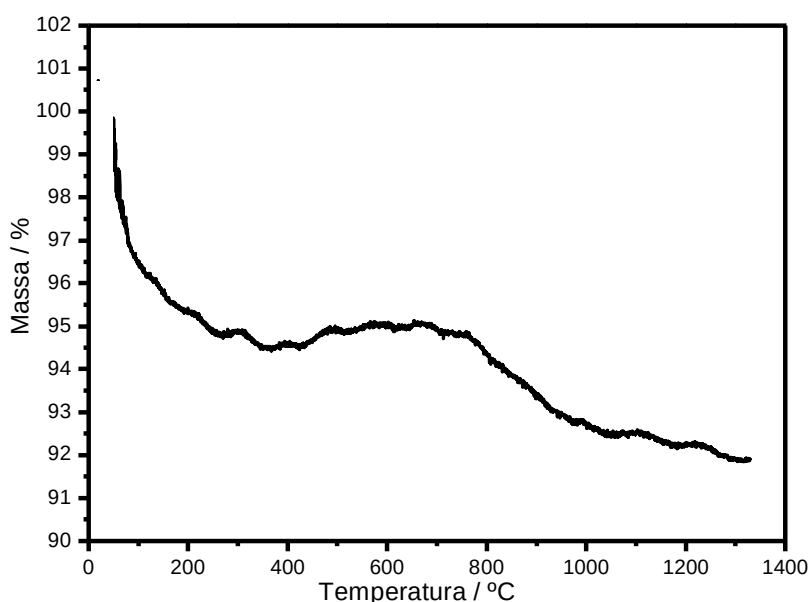


Figura 31 – Curva TG para amostra HA com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N₂.

A perda de massa mais significativa nas amostras ocorre até temperatura aproximadas próximas a 400°C, cerca de 5,5% para a amostra HA, 6,5% para HA1 e 7,3% para HA10, que pode estar associado à perda de moléculas de H₂O e CO₂ presentes nestas amostras. Nessa faixa também é observado a decomposição de material orgânico, logo o aumento da perda de massa nessa faixa para as amostras que contém gelatina é atribuída a decomposição da gelatina.⁵⁹

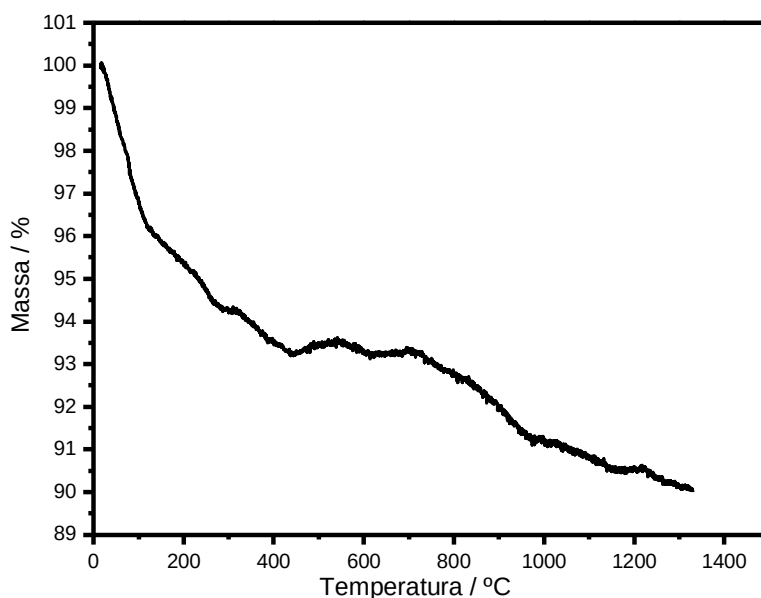


Figura 32 – Curva TG para amostra HA1 com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N₂.

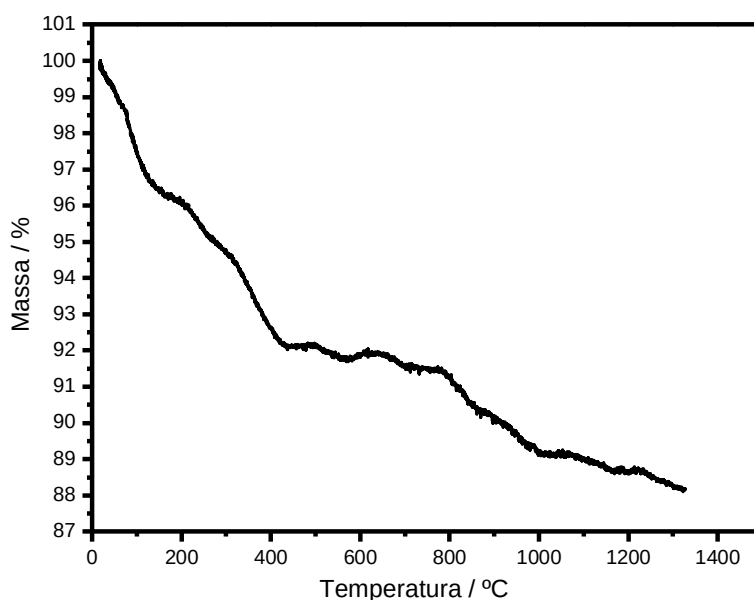


Figura 33 – Curva TG para amostra HA10 com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N₂.

Após a temperatura de 400°C a perda de massa permanece constante ou varia muito pouco até a temperatura de 800°C. Na faixa de 800 a 1000°C ocorre a segunda perda significativa de massa podendo ser relacionada a decomposição de hidroxiapatita deficiente em cálcio levando à formação de HA estequiométrica e TCP. Já a pequena e contínua perda de massa observada acima de 1000°C pode estar relacionada à desidroxilação e/ou decomposição da hidroxiapatita.⁷⁹⁻⁸⁰

5.7 TESTE MICROBIOLÓGICO EM PRESENÇA DE SALIVA HUMANA

Após os testes qualitativos que revelaram a quantidade ideal de HA a ser utilizada, foi realizado teste quantitativo que determinou a funcionalidade do antibiótico associado à HA na presença de saliva. O teste qualitativo foi de importância determinante para a escolha da quantidade de HA que deveria ser utilizada uma vez que as contagens microbiológicas em alguns casos não eram possíveis de serem realizadas. Como se observa na Figura 34, onde ambas as amostras de controle, usando 10 e 100 μL da mistura saliva e HA, há impossibilidade de se efetuar a contagem de UFC devido ao total preenchimento da superfície de ambas as placas. Também é possível perceber que, embora incontável, a amostra A mostrou-se com colônias mais bem definidas devido ao menor número de UFC presentes. A partir destas observações decidiu-se por utilizar uma quantidade da mistura igual a 10 μL (saliva + caldo BHI + HA).

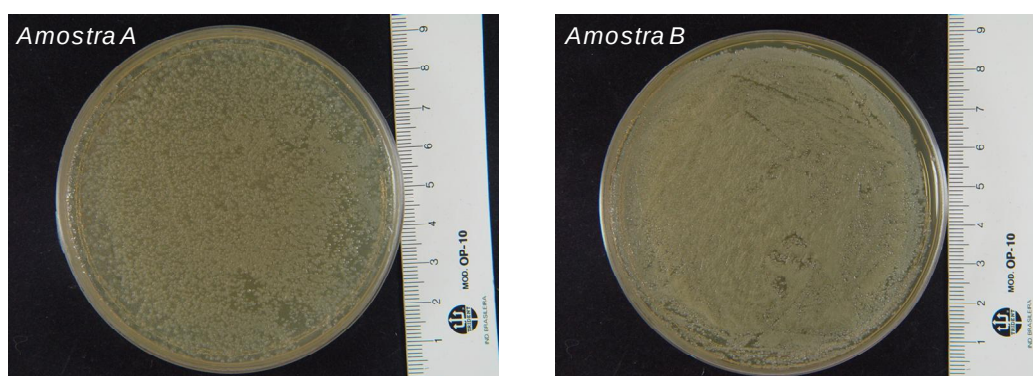


Figura 34 - Unidades formadoras de colônia (UFC/ml) dos diferentes microrganismos contidos na saliva, (a) controle BHI puro mais 10 μL de saliva e (b) controle BHI puro mais 100 μL de saliva .

De mesmo modo a contagem evidenciada para o número de colônias formadas nas placas obtidas da semeadura do material dos tubos A e B, verificou-se que poderia ser realizado um teste quantitativo utilizando-se 25 mg de HA com 10 μL

de saliva, pois o número de colônias apresentado nesta análise se revelou suficiente para o teste com a HA impregnada com gentamicina. A Figura 35 mostra o conjunto das fotografias das placas obtidas da semeadura do tubo A em quantidades iguais a 10, 20, 50 e 100 μL do caldo infuso com saliva.

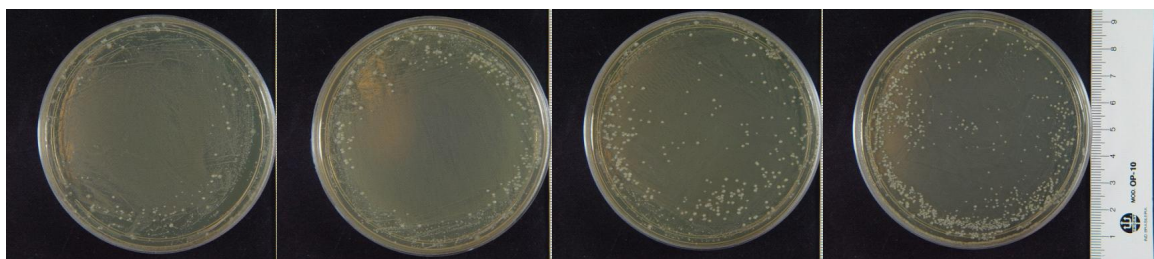


Figura 35 - Avaliação da atividade antimicrobiana da amostra de HA com variação da quantidade de material semeado igual a 10, 20 50 e 100 μL , respectivamente nas placas A, B, C, e D incubadas em caldo BHI contendo 0,1 mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar.

A Figura 36 traz as fotografias das amostras de controle compostas por BHI+saliva (alíquota padrão de 10 μL da mistura) com as contagens em UFC total que ao serem convertidas para UFC/mL de saliva aumentam 10 vezes (convertendo 0,1 mL da alíquota de saliva para 1 mL).⁴¹

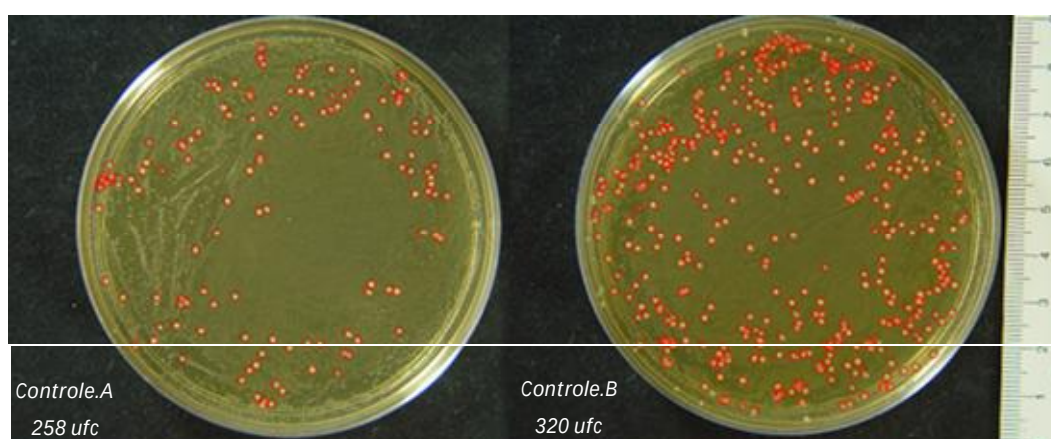


Figura 36 - Avaliação da atividade antimicrobiana através da contagem das unidades formadoras de colônia das amostras de controle com suas respectivas contagem em UFC de saliva. Os pontos vermelhos representam as colônias contadas em UFC.

A seguir são apresentadas as figuras com as fotografias dos conjuntos das contagens em duplicatas (Figuras 39-41) para as amostras sem gentamicina, HA, HA1, HA6, HA10 e HA60 e com gentamicina, HAGNT, HA1GNT, HA6GNT, HA10GNT e HA60GNT. Para todos os casos as figuras A e B representam o conjunto de amostras de HA sem gentamicina e C e D representam aquelas com gentamicina.

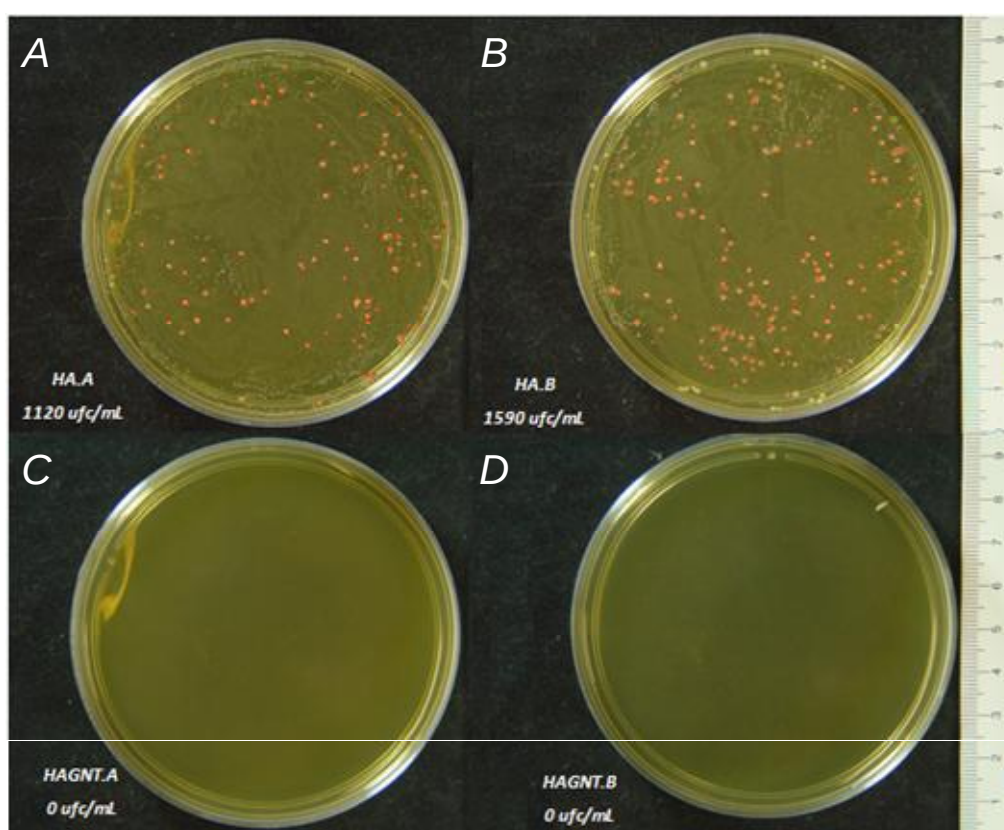


Figura 37 - Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA com adição de gentamicina (HAGNT.A e HAGNT.B) e sem gentamicina (HA.A e HA.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina.

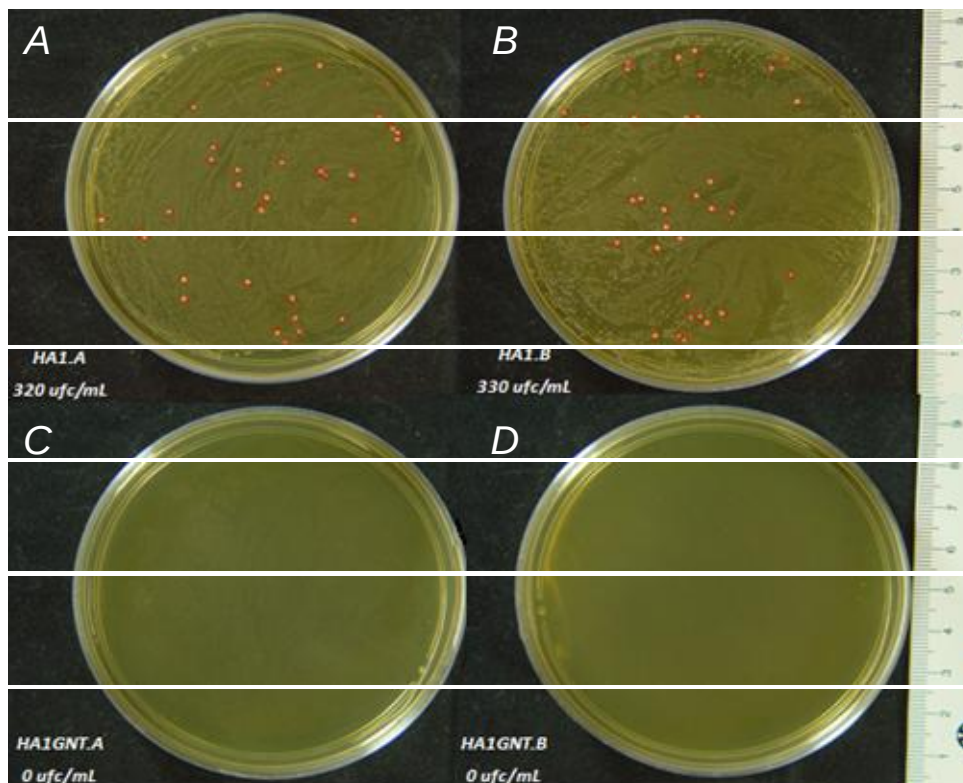


Figura 38 - Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA1 com adição de gentamicina (HA1GNT.A e HA1GNT.B) e sem gentamicina (HA1.A e HA1.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina.

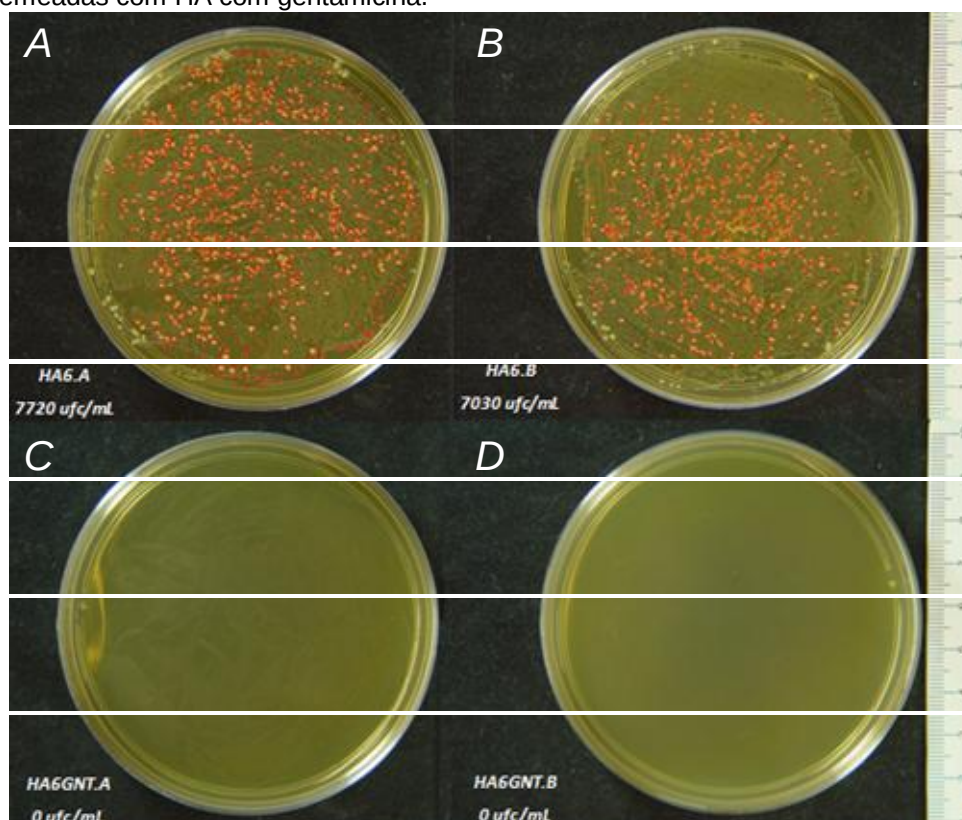


Figura 39 - Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA6 com adição de gentamicina (HA6GNT.A e HA6GNT.B) e sem gentamicina (HA6.A e HA6.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina.

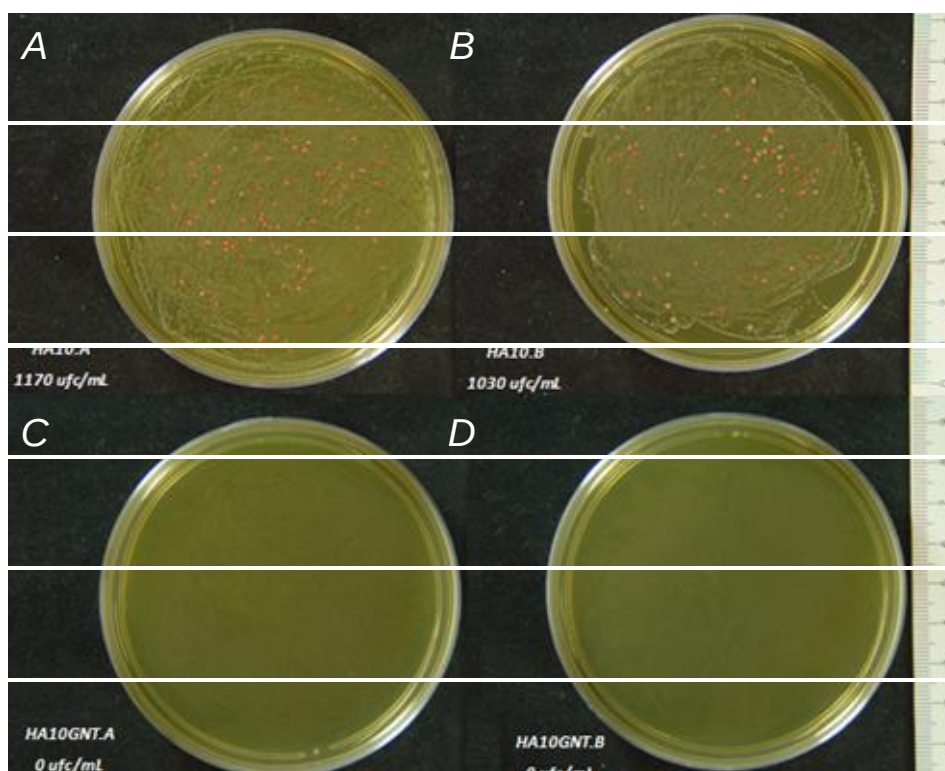


Figura 40 - Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA10 com adição de gentamicina (HA10GNT.A e HA10GNT.B) e sem gentamicina (HA10.A e HA10.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina.

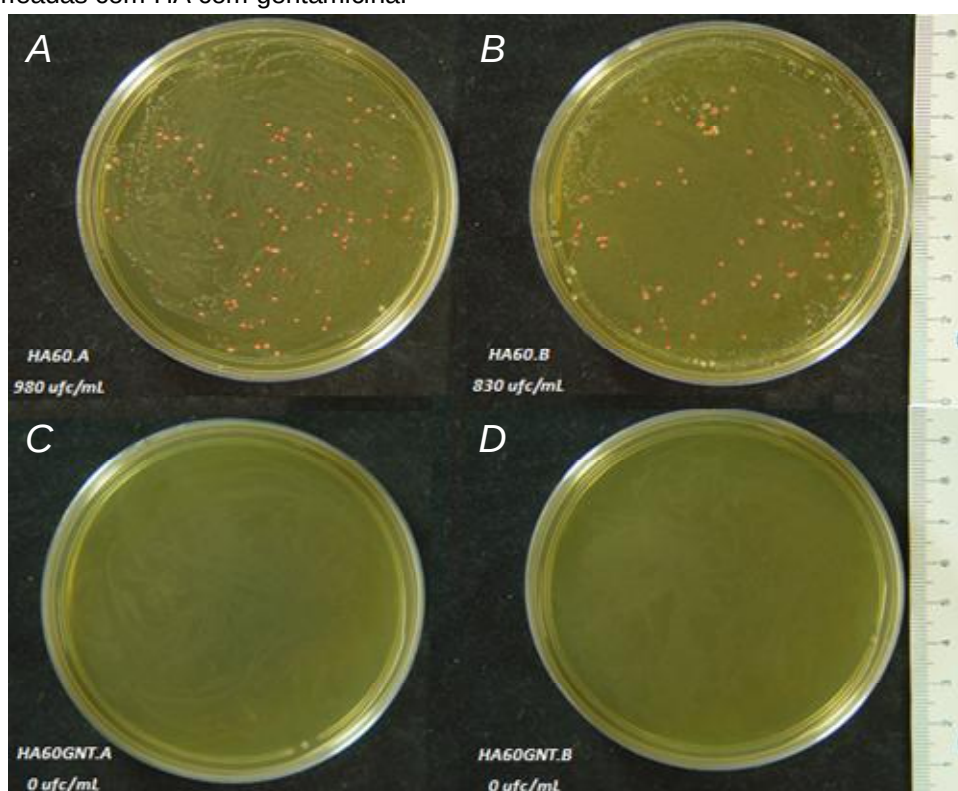


Figura 41 - Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de hidroxiapatita HA60 com adição de gentamicina (HA60GNT.A e HA60GNT.B) e sem gentamicina (HA60.A e HA60.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina.

Todos os testes com as amostras de HA com gentamicina revelaram valor igual a zero UFC/mL em sua contagem, mostrando que a gentamicina não sofreu alteração de suas propriedades ao ser associada à hidroxiapatita por este processo e, portanto mantendo-se eficaz em relação à sua função.

Para as amostras onde observou-se a presença de UFC, a contagem foi feita após 48 horas de incubação, o que tornou as colônias maiores sem aumentar significativamente o número de colônias formadas (Figuras 42-47), possibilitando uma contagem ainda mais fácil pela utilização do software citado. A diferença entre algumas contagens se dá pelo fato de que a colônia após 24 horas de incubação não foi identificada devido ao seu pequeno tamanho (muito próximo ao pó de HA disperso juntamente na placa). Nesse caso, a contagem utilizando o software após 48 horas é mais indicada para reduzir o risco de erro durante este procedimento.

Nas figuras 42 a 47 são apresentadas as fotografia das placas de Petri dos testes realizados após 48 horas de incubação.

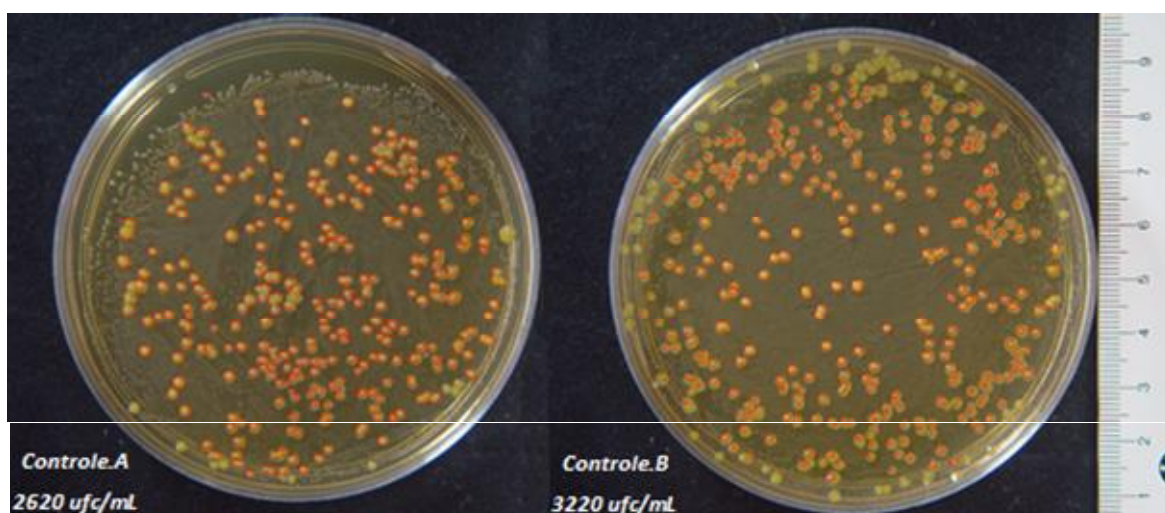


Figura 42 - Amostras de controle após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL.

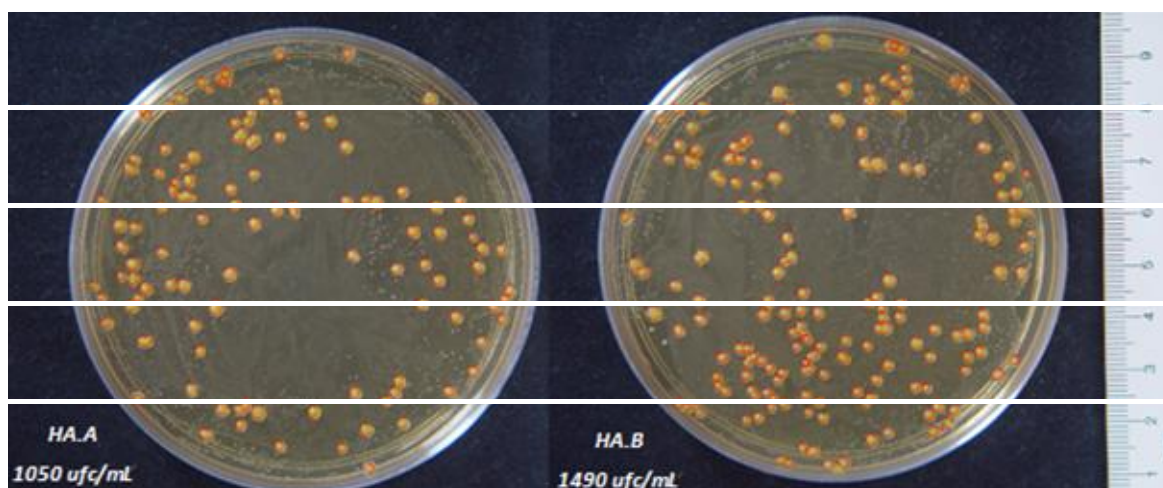


Figura 43 - Amostras HA sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL.

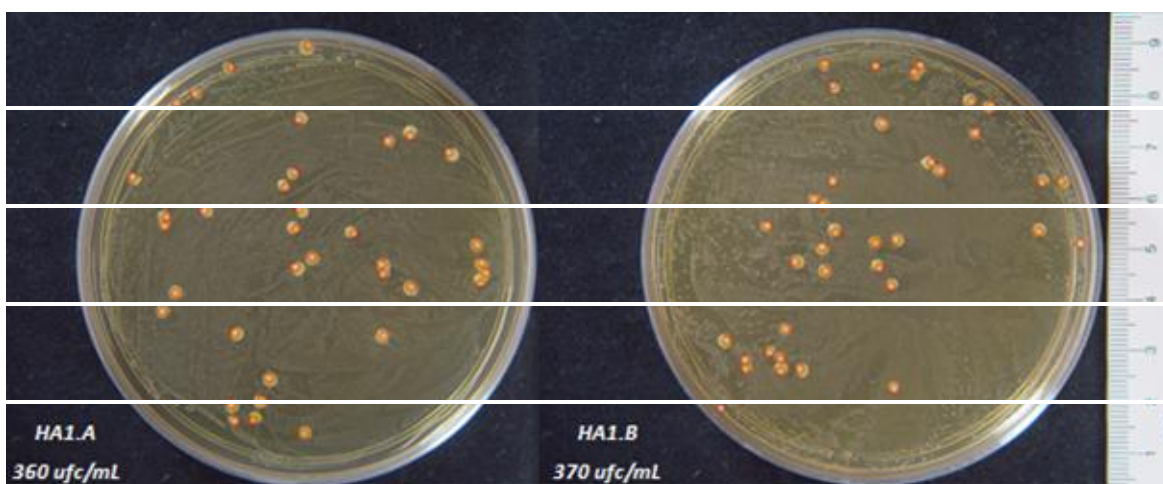


Figura 44 - Amostras HA1 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL.

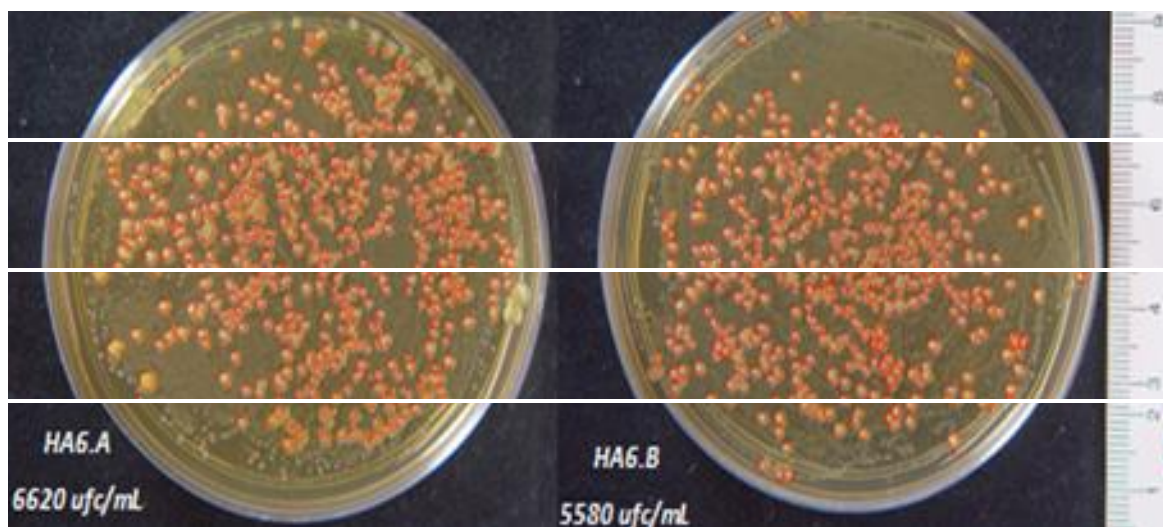


Figura 45 - Amostras HA6 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL.

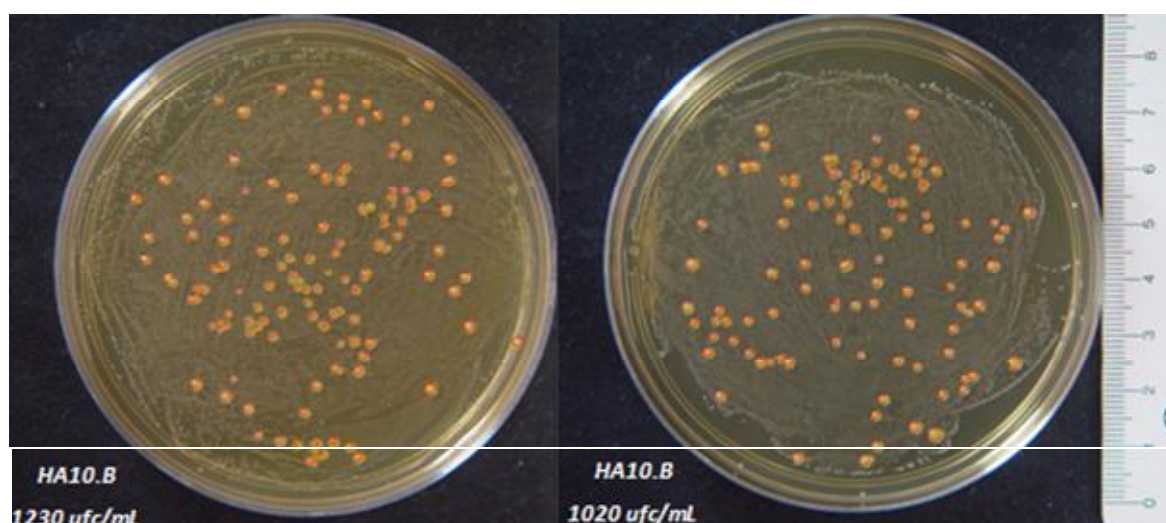


Figura 46 - Amostras HA10 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL.

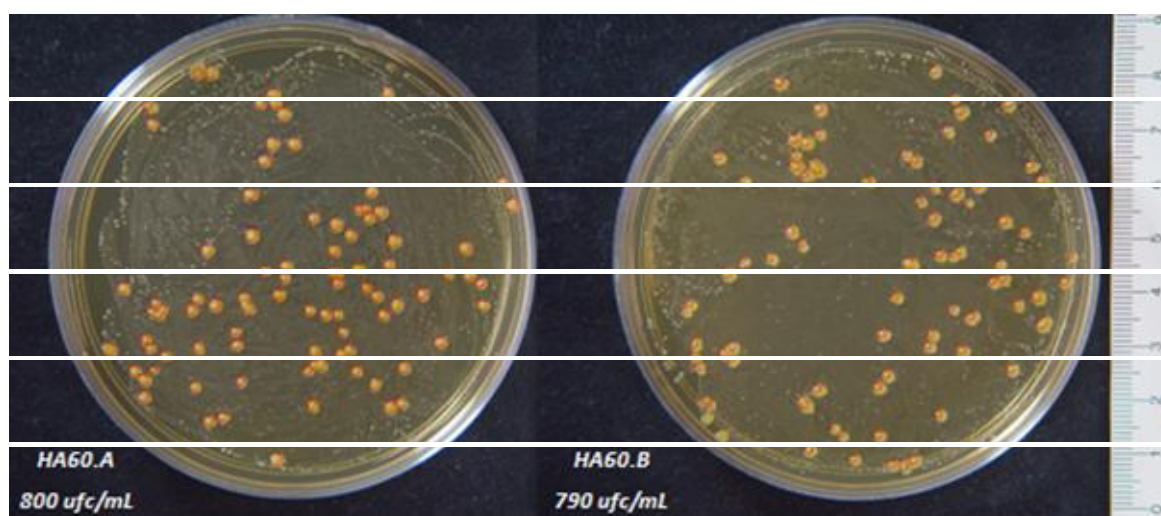


Figura 47 - Amostras HA60 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL.

Tabela 9 - Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA sem adição e com a adição de gentamicina, incubadas em caldo BHI com 0,1 mL de saliva humana e semeadas em placas de ágar. Contagens após 24 e 48 horas.

AMOSTRAS	Contagem 24 horas (UFC/mL)			Contagem 48 horas (UFC/mL)		
	A	B	C	A	B	C
Controle	2580	3200	1410	2620	3220	1010
HA	1120	1590	2970	1050	1490	2820
HA1	320	330	980	360	370	1000
HA6	7720	7030	5100	6620	5580	4160
HA10	1170	1030	640	1230	1020	630
HA60	980	830	2940	800	790	2700
HAGNT	0	0	0	0	0	0
HA1GNT	0	0	0	0	0	0
HA6GNT	0	0	0	0	0	0
HA10GNT	0	0	0	0	0	0
HA60GNT	0	0	0	0	0	0

Através da análise dos dados da Tabela 9 é possível observar que em alguns casos, comparando-se os valores obtidos para 24 e 48 horas, houve aumento ou redução da contagem do número de colônias. Isso se deve ao fato de que após 48 horas a definição dos objetos contáveis pelo software para UFC é maior e a mesma contagem após 24 horas de incubação apresenta menor tamanho para estes objetos identificados como colônias, sendo, portanto, incluídos na contagem, como é o caso do pó da própria hidroxiapatita disperso na superfície da placa de Petri.

Também foi possível verificar que a hidroxiapatita sem gentamicina mostrou ser um inibidor do crescimento de microrganismos e que quando associada à gentamicina mostrou-se bastante eficaz, inibindo completamente o crescimento de microrganismos contidos na saliva analisada.

5.7.1 Tratamento estatístico dos dados coletados nas contagens de UFC/mL

Um estudo complementar através do tratamento estatístico das contagens UFC/mL foi realizado utilizando os dados obtidos das amostras submetidas à ação do sulfato de gentamicina, que estão representadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA sem adição de gentamicina, incubadas em caldo BHI com 0,1 mL de saliva humana e semeadas em placas de ágar. Contagens após 24 e 48 horas para coleta de dados para tratamento estatístico.

AMOSTRAS		Contagem 24 horas (UFC/mL)			Contagem 48 horas (UFC/mL)		
		A	B	C	A	B	C
Tubo 1	Controle	1990	480	260	2010	560	290
	HA	480	660	620	510	720	650
	HA1	250	100	140	300	140	200
	HA6	820	8330	3850	8450	9570	4010
	HA10	890	1510	350	920	1680	390
	HA60	4850	5300	2680	5000	5510	2800
Tubo 2	Controle	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$
	HA	2650	1110	5260	2900	1280	5530
	HA1	70	290	80	400	320	110
	HA6	240	80	280	210	80	320
	HA10	470	630	490	810	650	580
	HA60	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$	$> 10^4$
Tubo 3	Controle	2580	3200	1410	2620	3220	1010
	HA	1120	1590	2970	1050	1490	2820
	HA1	320	330	980	360	370	1000
	HA6	7720	7030	5100	6620	5580	4160
	HA10	1170	1030	640	1230	1020	630
	HA60	980	830	2940	800	790	2700

O novo experimento para aquisição dos dados da análise quantitativa (10 µL da mistura HA+saliva+BHI com contagens após 24 e 48 horas) foi efetuado

conforme o experimento padronizado para complementar o estudo estatístico destas contagens. Na Tabela 10 os resultados do novo experimento estão representados como “Tubo 1” e “Tubo 2” e o resultado das contagens obtidas no experimento anterior foram incluídas na tabela como “Tubo 3”.

As contagens foram obtidas de três tubos distintos para cada uma das amostras avaliadas com a mistura HA+saliva+BHI e cada uma foi igualmente submetida a uma contagem em triplicata (A, B e C) perfazendo um número total de resultados experimentais para cada amostra igual a 9 ($n = 9$).

Os testes estatísticos podem ser divididos em dois grandes grupos, conforme fundamentam ou não os seus cálculos na premissa de que a distribuição de freqüências dos erros amostrais é normal e os erros independentes. Estes testes estatísticos são definidos como *paramétricos* e *não-paramétricos* e se referem à média e ao desvio padrão, que são os parâmetros que definem as populações que apresentam distribuição normal.⁸¹⁻⁸³ Os resultados foram expressos através de média $\pm$ erro padrão da média através de um estudo paramétrico utilizando a transformação dos dados para Log (x).

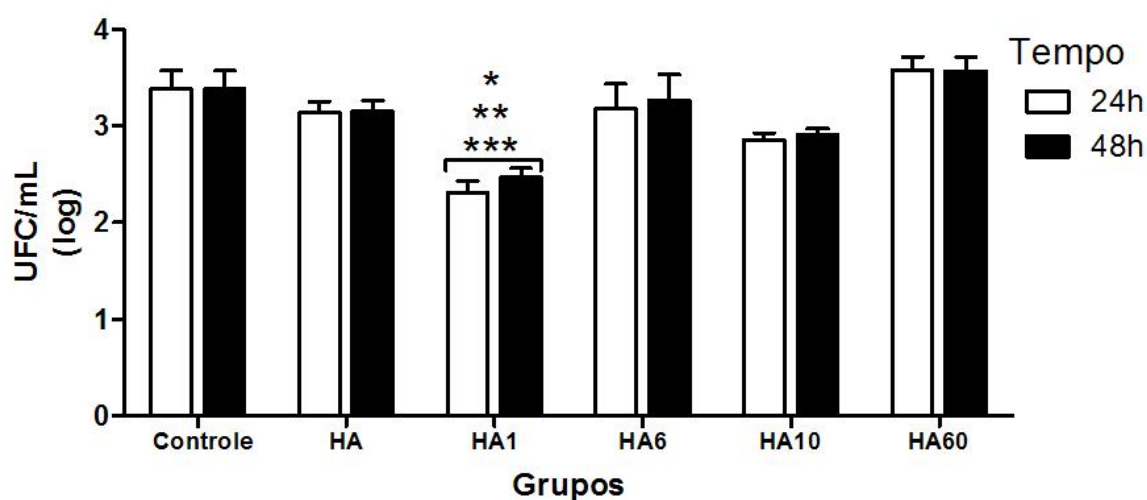


Figura 48 – Média e erro padrão dos valores transformados em Log(x) de UFC/mL de bactérias totais de saliva expostas à quantidades diferentes de HÁ. * $p < 0,05$ com HA6, ** $p < 0,01$ com Controle e *** $p < 0,001$ com HA60 (ANOVA com pós-teste de Bonferroni).

Na Figura 48 é possível observar a média $\pm$ erro padrão da média para as amostras expressas em Log (x). Na comparação entre os grupos de amostras, os testes de ANOVA com pós-teste de Bonferroni foram aplicados com nível de significância de 0,05 ou 5% (p) representado por um asterisco (*) e valores inferiores a este valor foram representados por dois asteriscos (**) ($p < 0,01$) e por três asteriscos (***) ($p < 0,001$). Neste estudo, os valores de UFC/mL $> 10^4$ apresentados na Tabela 10 foram considerados simplesmente como 10^4 .

A transformação dos dados é uma prática comum no tratamento de dados estatísticos para testes microbiológicos e é aplicada sempre que algum dos requisitos da estatística paramétrica como normalidade da distribuição dos erros ou homogeneidade das variâncias não puder ser preenchidos pelos dados amostrais é possível optar pela transformação dos dados antes de optar pela aplicação da estatística não-paramétrica.⁸¹⁻⁸³

6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos mostrou que:

- O método proposto com precipitação em meio gelatinoso levou a obtenção de HA pura, não coexistindo outras fases referentes a sistema Ca-P.
- A concentração de gelatina influencia na morfologia das amostras, como comprovado pela análise dos resultados de distribuição granulométrica, área superficial específica e MEV.
- As amostras de HA preparadas possuem efeito inibidor no crescimento bacteriano.
- O processo utilizado para incorporação da gentamicina na HA manteve a propriedade antibiótica do fármaco e o mesmo foi liberado durante o teste em presença de saliva.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

São sugestões para trabalhos futuros relacionados a este estudo:

- Estudo das propriedades mecânicas da hidroxiapatita obtida por precipitação nas diferentes concentrações utilizadas no meio gelatinoso com e sem submissão a tratamento térmico (calcinação e sinterização);
- Verificação das propriedades do material associado ao antibiótico para utilização como cimento ósseo;
- Estudo da liberação controlada do antibiótico;
- Estudo da incorporação de outros antibióticos e agentes de terapia associada.

8 REFERÊNCIAS

1. SANTOS, M. H.; DE OLIVEIRA, M.; SOUZA, L. P. F.; MANSUR, H. S.; VASCONCELOS, W. S. Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process. *Materials Research*, vol. 7, nº 4, p. 625 – 630, 2004.
2. SANTOS, L. A. Desenvolvimento do cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para o uso na área Médico-Odontológica, 2002, 274f. Tese (Doutorado em Materiais e Processos de Fabricação) – UNICAMP, Campinas, 2002.
3. BERUBE, P.; YANG, Y.; CARNES, D. L.; STOVER, L. E.; BOLAND, E. J.; ONG, J. L. The effect of sputtered calcium phosphate coatings of different cristallinity on osteoblat differentiation, *Journal Periodontal*, vol. 70, nº 10, p. 1697-1709, 2005.
4. WAHL, D. A; CZERNUSKA, J. T. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair, *European Cells and Materials*, vol. 11, p. 43-56, 2006.
5. NASCIMENTO, C.; ISSA, J. P. M.; OLIVEIRA, R. R.; IYOMAZA, M. M. Biomaterials applied to the bone healing process, *Int. J. Morph.* vol. 25, nº 4, p. 839-846, 2007.
6. TADIC, D.; WELZEL, T.; SIDEL, P.; WÜST, E.; DINGELDEIN, E.; EPPLE, M. Controlled release of gentamicin from biomimetic calcium phosphate in vitro - Comparison of four different incorporation methods, *Matt-wiss - Werkstofftech*, vol. 35, nº.12, 2004.
7. SCHNIEDERS, J.; GEBURECK, U.; THULL, R.; KISSEL, T. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(latic acid-co-glycolic acid) composite bone cement, *Biomaterials*, nº 27, p. 4239-4249, 2006.
8. RADIN, S.; CAMPBEL, J. T.; DUCHEYNE, P.; CUCKLER, J. M.; Calcium phosphate ceramic coating as carriers of vancomycin, *Biomaterials*, nº 18, p. 777-782, 1996.
9. HILLIG, W. B.; CHOI, Y.; MURTHA, S.; NATRAVALI, N.; AJAYAN, P. An open-pored gelatin hydroxyapatite composite as a potential bone substitute, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, vol. 19, p. 11-17, 2007.

10. MATSUDA, M.; KOYAMA, Y.; HOSAKA, Y.; UEDA, H.; WATANABE, K.; ARAYA, T.; IRIE, S.; TAKEHANA, K. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis, J. Nutr. Sci. Vitaminol, vol. 52, p. 211-215, 2006.
11. LUCKE, M.; SADONI, S.; HAAS, N. P.; RASCHKE, N. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats, Bone, vol. 32, p. 521-531, 2003.
12. CANO, J. M.; HACHEN, A.; RUZAFKA, A. G.; RODRIGUEZ, D.; SABATE, A. F.; SANTOS, L. A. Sulfato de cálcio associado a gentamicina como material de substituição óssea, Revista Brasileira de Ortopedia, vol. 34, nº. 5, p. 355-360, 1999.
13. MANKANI, M. H.; KUZNETSOV, S. A.; WOLF, R. M.; MARSHALL, G. W.; ROBEY, P. G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible, Stem Cells, vol. 24, p. 2140-2149, 2006.
14. VAZ, G. J. O. Propriedades biocerâmicas de porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias primas de origem orgânica sintética, 2007, 108f. Dissertação (Mestrado em Processos de Fabricação) – Universidade Federal de Ouro Preto/ Universidade Estadual de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
15. PAIVA, A. O. Obtenção, caracterização e estudo *in vitro* do vidro bioativo VH30 e compósitos vidro bioativo/polihidroxibutirato, 2005, 95f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Federal de Itajubá, SP, Itajubá, 2005.
16. SISTEMAS DE HAVERS, 2007. Disponível em <<http://br.geocities.com/investigandoociencia/sistemaesqueleticocamad as.gif>> acesso em 20 de janeiro de 2009.
17. GUTIERREZ, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S.; CABRAL, A. T.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J. D. Substitutos Ósseos: Conceitos Gerais e Estado Actual, Arquivos de Medicina, vol.19, nº4, p. 153-162, 2006.
18. PRIOR, D. V. Localized drug delivery via collagen-based biodegradable matrices, Pharmaventures, p. 39-42, 2004.

19. ZHANG, Z. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limited split wastes, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemistry*, vol.90, p.23-28, 2006.
20. OGAWA, C. A. e PLEPIS, A. M. de G. Estudos preliminares de liberação de ciprofloxacina em compósitos de hidroxiapatita: colágeno, *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, vol. 17, nº 3. p. 123-130, 2001.
21. ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas Bioativas – Estado da Arte, *Química Nova*, vol.29, nº. 1, p.100 -104, 2006.
22. VALLET-REGI, M e GONZÁLES-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in solid state chemistry*, vol. 32, p. 1-31, 2004.
23. RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação, *Revista Dental Press Periodontia Implantológica*, vol. 1, nº 3, p. 39-50, 2007.
24. KAWACHI, Y. E.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar, *Química Nova*, vol. 23 nº. 4, p. 518 – 522, 2000.
25. ASSIS, C. M.; VERCIK, L. C. O.; SANTOS, M. L.; FOOK, M. V. L.; GUASTALDI, A. C. Comparison of crystallinity between natural hydroxyapatite and synthetic cp-Ti /HA coatings, *Materials Research*, vol. 8, nº. 2, p. 207-211, 2005.
26. BAYRAKTAR. D; TAS. A. C. Chemical preparation of carbonated calcium hydroxyapatite powders at 37°C in urea-containing synthetic body fluids, *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 19, p.2573-2579, 1999.
27. SANTOS, M. L.; FLORENTINO, A, O.; SAEKI, M. J.; APRECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; GUASTALDI, A. C. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico, *Eclética Química*, vol. 30, nº. 3, p. 29 – 35, 2005.
28. ORTEGA, F. S.; INOSTROZA, P. A. S.; PANDOLFELLI, V. C. Avaliação de sistemas gelificantes para a produção de cerâmicas porosas através da técnica “gelcasting” de espumas. *Cerâmica*, vol. 46, nº. 300, p. 225 – 229, 2000.

29. BARBATO, D. A.; CORRÊA, D. T. S.; NOVAKI, L.; ANDRADE, A. V. C.; DA SILVA, J. C. Z. Caracterização de amostras de biovidro em meio de fluido de corpo simulado (SBF), In: XI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UEM, Livro de Resumos do XI EAIC, 2002.
30. DA COSTA, E.; NOVAKI, L.; TSAI H. I.; PEREIRA, L. T. P.; ANDRADE, A. V. C.; SANTOS, C. O. P.; BORGES, C. P. F.; MARQUES, M. B.; DA CRUZ, A. C. C.; DOS SANTOS, F. A.; DA SILVA, J. C. Z. Sinterização de biovidros na forma de partículas e do tipo espuma, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, vol. 30, p. 51-54, 2003.
31. DE CAMPOS, S. D.; DE CAMPOS, É, A.; DA SILVEIRA, C. B.; BINI, R. A. Biomaterials based on Na_2O - CaO - SiO_2 - P_2O_5 prepared with sawdust or corn glucose: effects on porosity and crystallinity, *Cerâmica*, nº.1, p. 274-279, 2005.
32. MARTINS, M. A. P., STARLING, S. M., BORGES, S. A. Utilização de gentamicina em neonatos atendidos em uma maternidade pública da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (1999), *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 41, nº. 1, 2005
33. ALT, V. BECHERT, T.; STEINRÜCKE, P, WAGENER, M.; SIDEL, P.; DINGELDEIN, E.; DOMANN, E.; SCHNETTLER, R. In Vitro Testing of Antimicrobial Activity of Bone Cement, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, *American Society for Microbiology*, vol. 48, nº 11, p. 4084-4088, 2004.
34. GIROT, A. L.; VERDIER, M. C.; TRIBUT, O.; SANGLEBOEUF, J. C.; ALLAIN, H.; OUDADASSE, H. Gentamicin-Loaded Calcium Carbonate Materials: Comparison of Two Drug-Loading Modes, *J. Biomed. Mater. Res. B. Pt. Appl. Biomater*, vol.73, nº 1, p. 164-170, 2005.
35. KIM, H. W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. E. Development of Hydroxyapatite Bone Scaffold for Controlled Drug Release via Poly (ε-caprolactone) and Hydroxyapatite Hybrid Coatings, *J. Biomed. Mater. Res. B. Pt. Appl. Biomater*, vol.70, nº 2, p. 240-249, 2004.
36. SILVERMAN, L. D.; LUKASHOVA, L.; HERMEN, O. T. Release of Gentamicin from a Tricalcium Phosphate Bone Implant, *Journal of orthopaedic research*, vol.25, p. 23-29, 2006.

37. STALLMAN, H. P., FABER, C., BRONKERS, A. L.; NIEUW, A. L.; WUISMAN, P. I. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile, BMC Musculoskeletal Disorders, vol. 7, nº 18, p. 1-8, 2006.
38. STIGTER, M.; BEZEMER, J.; GROOT, K.; LAYROLLE, P. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy, Journal of Controlled Release, vol. 99, p. 127-137, 2004.
39. TORRADO, S.; FRUTOS, P. FRUTOS, G. Gentamicin bone cements: characterisation and release (in vitro and in vivo assays), International Journal of Pharmaceutics, vol. 217, p. 57-69, 2001.
40. KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. Química Farmacêutica, 1ª. edição. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982, p. 575-578 e 601-603.
41. LOURENÇO, F. R.. Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em ágar – proposta de delineamento experimental, 2006, 218f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle de Farmacêuticos) – USP, São Paulo, 2006.
42. SILVA, P. Farmacologia, 7ª. edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006, p. 980-985.
43. BIER, O. Fisiologia bacteriana. In: Microbiologia e Imunologia. 23.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1984. cap.3, p.43-77.
44. MURUGAN, R., RAO, K. P. Controlled release of antibiotic from surface modified coralline hydroxyapatite, Trends Biomater. Artif. Organs., vol. 16, nº 1, p. 43-45, 2002.
45. PEÑA, E.D.; FRUTOS, P. FRUTOS, G.; RIEND, J. M. B. Gentamicin sulphate release from a modified commercial acrylic surgical radiopaque bone cement. I. Influence of the gentamicin concentration on the release process mechanism, Chem. Pharm. Bull, vol. 50, nº9, p. 1201-1208, 2002.
46. LI, X. D., HU, Y. Y. The treatment of osteomyelitis with gentamicin-reconstituted bone xenograft-composite, The Journal of Bone and Joint Surgery, vol. 83-B, nº 7, p. 1063-1068, 2001.

47. SIVAKUMAR, M., RAO, P. K. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite–gelatin composite microspheres, *Biomaterials*, vol. 23, p. 3175-3181, 2002.
48. CHEN, M. TAN, J.; LIAN, Y.; LIU, D. Preparation of gelatin coated hydroxyapatite nanorods and the stability of its aqueous colloidal, *Applied Surface Science*, vol. 254, p. 2730-2735, 2008.
49. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª edição. São Paulo: Bookman, 2002.
50. DOURADO, E. R. *Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio*, 2006, 128f. Dissertação (Mestrado em processos de fabricação) – CBPF, Rio de Janeiro, 2006.
51. AVES, E. P. Comparative study of hydroxyapatite coatings obtained by sol-gel and electrophoresis on titanium sheets, *Revista Matéria*, vol. 12 nº. 1, p. 156-163, 2007.
52. JUNIOR, W. F. A. *Apostila de Difração de Raios X*, 2004, disponível em <<http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br>>. Acesso em 20 de janeiro de 2009.
53. LAING, M. *An introduction to the scope potencial and applications of X-ray analysis*, International Union of Crystallography, University College Cardiff Press, College Cardiff, 36p. 2001.
54. WEINAND, W. R.; GONÇALVES, F. F. R.; FEIDEN, A.; BERVEGLIERI, C. I.; GRANDE, H. L. C.; LIMA, W. M. Influência da temperatura de sinterização nas propriedades físico-químicas e na microestrutura da hidroxiapatita natural obtida de ossos de peixes, 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais - CBECiMat, Livro de Resumos, Foz do Iguaçu, 12p. 2006.
55. MENECHIN, C. DALCONI, M. C.; NUZZO, S.; MOBILIO, S.; WENK, R. H. Rietveld refinement n X-ray diffractions on patterns of bioapatite on human fetal bonés, *Biophysical Journal*, vol. 84, p. 2021-2029, 2003.
56. LIPSON, H. *The study os metals and allows by X-ray powder diffraction methods*, International Union of Crystallography, 18p. 2001.

57. ANGELO, L. C. Síntese e caracterização de nanocompostos hidroxiapatita-gelatina obtidos pelo método de precipitação utilizando o método de Rietveld e IVTF, 2008, 122f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
58. WEBER, C. Influência do processamento via emulsão em compósitos de hidroxiapatita-zircônia, 2007, 59f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
59. OLIVEIRA, F. P. DE, 2008: Influência do processamento na obtenção de biocerâmicas a base de hidroxiapatita, 2008, 119f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
60. TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. Química Nova, vol.24, nº 6, p. 808-818, 2001.
61. SHAWN, D. J. Introdução à Química de colóides e de superfícies. São Paulo. Ed. Edgar Blucher, 1975.
62. PIMENTEL, A. S.; ARBILLA, G. Cinética não isotérmica da análise térmica dos sólidos. Química Nova, vol. 21, nº3, p.263-266, 1998.
63. VOGEL, J. B. Análise química quantitativa, 6ª ed., Rio de Janeiro, LTC, 2002.
64. CARRODÉGUAS, R.G.2000: Cementos ósseos de fosfato de calcio. 2000, 156f. Tese (Doutorado), Universidad de La Habana, La Habana, Centro de Biomateriales, 2000.
65. TAS. A.C. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids, Biomaterials, vol. 21, p. 1429-1428, 1999.
66. FONTES, S.S.; JUNIOR, G. G. G.; SADER, M. S.; OGASAWARA, T. Análise termodinâmica aplicada ao beta-fosfato tricálcico dopado com magnésio, 51º Congresso de Cerâmica, Livro de Resumos, Salvador, 11p., 2007.

67. APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A. C. Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP), *Química Nova*, vol. 30, nº 4, p. 892-896, 2007.
68. FILHO, E. A.; ASSIS, C. M.; VERCIK, L. O.; GUASTALDI, A. C. Biomateriais: Deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-Cp modificada por aspersão térmica, *Química Nova*, vol. 30, nº 5, p. 1229-1232, 2007.
69. American Society for Testing and Materials - ASTM F1185-88 (Reapproved 1993) Standard specification for composition of ceramic hydroxylapatite for surgical implants.
70. CARVAJAL, J. R. Apostila: Structural analysis from powder diffraction data the Rietveld method, disponível em http://imaisd.usc.es/riaidt/raiosx/manuais/the_rietveld_method_97.pdf. Acesso em 20 de janeiro de 2009.
71. CASAGRANDE, S. P., BLANCO, R. C. Método de Rietveld para El estudio de estructuras cristalinas, Laboratorio de Datación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, 5p. 2004.
72. MOHSENI, K. Characterization of Precipitated Calcium Carbonate (PCC) compounds on the basis of powder X-ray diffraction data, 2007, 169f. Tese (Doutorado em Ciência de Materiais), Universidade Karlsruhe, Theran, Iran, 2007.
73. MOREIRA, E. L.; EON, J.; ROSSI, A. M. 2006: Análise por difração de raio-x de uma hidroxiapatita carbonatada usando o método de Rietveld, Livro de Resumos 28º SBQ, p. 152, 2006.
74. ARAÚJO, J. C.; SENA, L.; BASTOS, I, N.; SOARES, G, D. A. Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios X, *Química Nova*, vol. 30, nº 8, p. 1853-1859, 2007.
75. RIBEIRO, C.; RIGO, E. C. S.; SEPÚLVEDA, P.; BRESSIANI, J. C.; BRESSIANI, A. H. A. Formation of calcium phosphate layer on ceramics with different reactivities, *Material Science and Engineering*, vol. 24, p. 631-636, 2004.

76. NARBAT, M. K.; ORANG, F.; HASHTJIN, M. S.; GOUDARZI, A. Fabrication of porous hydroxyapatite-gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering, *Iranian Biomedical Journal*, vol.10, nº 4, p. 215-223, 2006.
77. KIM, H. W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. E. Porous scaffolds of gelatin–hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: characterization and antibiotic drug release, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 74-B, 686-698, 2005.
78. GOUVEIA, D. S.; COUTINHO, A. C. S.; GUIMARÃES, L. M. F.; BRESSIANI, A. H. A.; BRESSIANI, J. C. Efeito da velocidade de adição do H_3PO_4 e da incorporação do Mg^{2+} na síntese do HA, 51º Congresso de Cerâmica, Livro de Resumos, Salvador, 12p., 2007.
79. LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; VICH, L.; SANDRI, M. Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite. *Biomaterials*, vol. 25, p. 1763-1770, 2004.
80. MOSTAFA, N. Y. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. *Materials, Chemistry and Physics*, vol.94, p.333-341, 2005.
81. DIAS, K. S.; ALMEIDA, D. S.; SILVA, A. B. L.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A. C.; SANTOS, T. C.; MELLO, I. C. M.; CARVALHO, A. C. S. ANTONIOLLI, A. R.; MARÇAL, R. M. Avaliação dos efeitos miorelaxante, antiespasmódico e antinociceptivo do extrato aquoso da *Phoradendron piperoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.17, p. 373-377, 2007.
82. SILVA, A. B. L.; DIAS, K. S.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A. C.; SANTOS, T. C.; MELLO, I. C. M.; LISBOA, A. C. C. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, A. R. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.16, p. 475-479, 2006.
83. CAMPOS, G. M. Estatística prática para docentes e pós-graduandos, disponível em http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/gmc_livro_cap13.html < Acesso em 12 de junho de 2009.
84. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Biblioteca Central Prof. Faris Michael. Manual de normalização bibliográfica para trabalhos científicos, Ponta Grossa, UEPG, 2005.