

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

JUSSANY MARIA DE BARROS MOREIRA

HIDROXIAPATITA ASSOCIADA À GENTAMICINA: UM ESTUDO DA
INFLUENCIA DA GELATINA NO MEIO DE PRECIPITAÇÃO E DO PROCESSO DE
SECAGEM NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO

PONTA GROSSA

2009

JUSSANY MARIA DE BARROS MOREIRA

HIDROXIAPATITA ASSOCIADA À GENTAMICINA: UM ESTUDO DA
INFLUENCIA DA GELATINA NO MEIO DE PRECIPITAÇÃO E DO PROCESSO DE
SECAGEM NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO

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: Dr^a. Sandra R. Masetto
Antunes
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane
P. Ferreira Borges

PONTA GROSSA

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

M838h Moreira, Jussany Maria de Barros
 Hidroxiapatita associada à gentamicina : um estudo da influência da gelatina no meio de precipitação e do processo de secagem na inibição do crescimento bacteriano . / Jussany Maria de Barros Moreira. Ponta Grossa, 2009.
 118f.
 Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientadora : Profa. Dra. Sandra R. Masetto Antunes
 Co-orientadora : Profa. Dra. Christiane P. Ferreira Borges

 1. Biomateriais. 2. Hidroxiapatita. 3. Gelatina. 4. Sulfato de gentamicina. 5. Ensaios microbiológicos. I. Antunes, Sandra R. Masetto. II. Borges, Christiane P. Ferreira. III. T.

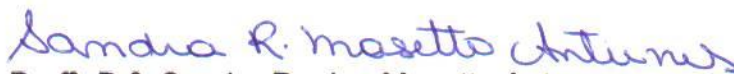
CDD : 547

TERMO DE APROVAÇÃO

JUSSANY MARIA DE BARROS MOREIRA

“HIDROXIAPATITA ASSOCIADA À GENTAMICINA: UM ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA GELATINA NO MEIO DE PRECIPITAÇÃO E DO PROCESSO DE SECAGEM NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO”

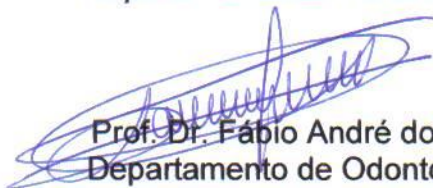
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Masetto Antunes
Departamento de Química,UEPG/PR



Prof. Dr. André Vitor Chaves de Andrade
Departamento de Física/UEPG/PR



Prof. Dr. Fábio André dos Santos
Departamento de Odontologia/UEPG/PR

Ponta Grossa, 27 de outubro de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu
esposo “Marcos Antonio Moreira” por sua
colaboração incondicional e
Pela conquista de mais esse
Objetivo em nossas vidas.

Amo muito você!

Á minha mãe “Iracema Fachini”
por ter me educado com todo
amor e carinho, estando sempre
pronta à colaborar.

E, finalmente, aos tesouros de
minha vida, meus filhos “Renan e Giovani”
por compreenderem que a minha ausência
teria fim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser minha estrela guia, durante todo o caminho percorrido.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Sandra Regina Masetto Antunes pelo carinho com que me acolheu, orientação e compreensão ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A Prof^ª. Dr^ª. Christiane P. F. Borges pela co-orientação, atenção e colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr . André Vitor Chaves de Andrade pelos ensinamentos e bons momentos de conversas.

Ao Prof. Dr . Fábio André dos Santos por estar sempre disposto em ajudar na realização e concretização deste trabalho.

Ao meu amigo e colega de mestrado Fábio Santana por toda explicação, atenção, compreensão e ajuda durante o mestrado.

Ao Fernando Ferreira pelas explicações no desenvolvimento do método.

Aos professores do Departamento de Química da UTFPR - Pato Branco pelo carinho com que me receberam e incentivo em iniciar o mestrado.

Á todos os professores de Pós-graduação em Química Aplicada pela dedicação em transmitir conhecimentos e, por abrir as portas da universidade, para que meu sonho se tornasse realidade.

Aos meus diretores Luiza Kupchak e Marcelo Oltramari pelo seu apoio, carinho e por sempre dizer sim, nos momentos em que eu mais precisei.

Aos meus colegas de trabalho do Colégio SESI, por estarem sempre torcendo por mim.

Às minhas amigas de estrada Edinéia, Edenes e Cristiane por todos os bons e maus momentos que passamos juntos, vocês fazem parte da minha história.

À toda a minha família pela compreensão da minha ausência em muitos momentos importantes.

À minha afilhada Monicaisa Roman por brincar e cuidar dos meus filhos.

À Berecy por muitas vezes substituir o meu papel de mãe.

À amiga e funcionária Danielli Baldin por estar sempre me ajudando.

Ao professor e meus amigos de CTG por entenderem que minha ausência tinha uma boa explicação e um dia chegaria ao fim.

À minha amiga Elizabeth Koltz Watthier, pelo apoio, força e consolo nos momentos difíceis.

À todos que de maneira direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho, e em especial a CAPES/PROAP pelo suporte financeiro e aos funcionários da UEPG.

Finalizando, agradeço a todos os colegas de mestrado que fizeram história em minha vida.

“Nada te perturbe.

Nada de espante.

Tudo passa.

Só Deus não muda.

A paciência tudo alcança.

Quem Deus tem, nada lhe falta!

Só Deus basta!”

(Santa Therezinha)

“A sabedoria é a coisa principal; adquiere, pois a sabedoria”,

“Emprega o que possues na aquisição de entendimento”

Provérbios 4:7

RESUMO

Estudos demonstram que a hidroxiapatita, vem se destacando entre as biocerâmicas, pois apresenta excelente biocompatibilidade com a fase mineral do osso humano, de fórmula estequiométrica $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$, com razão Ca/P igual a 1,67. Tem a capacidade de unir-se quimicamente com o tecido, o que a torna um material bioativo. Apesar da estrutura e propriedades do tecido ósseo representar um dos maiores campos de estudo, na atualidade o interesse está na possibilidade de incorporação de drogas a esses biomateriais. Neste trabalho foram preparados compósitos de HA e HA:Gel pelo método da precipitação, que consistiu na mistura de uma solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (2 mol.L^{-1}) com uma solução de H_3PO_4 ($1,2 \text{ mol.L}^{-1}$), sob agitação constante, aquecimento e controle de pH. Os precipitados obtidos foram envelhecidos por um dia e posteriormente uma parte deles foi seco em estufa à 100°C e a outra parte foi liofilizada por 48 horas. Os pós foram peneirados, calcinados e em seguida adicionados sulfato de gentamicina ($\text{C}_{21}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_7 \cdot 2,5\text{H}_2\text{SO}_4$) em concentrações de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0% em massa. Os pós obtidos foram caracterizados por: espectroscopia de absorção na região do infravermelho; difratometria de Raios X; microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDS), microscopia eletrônica de transmissão (MET), análises granulométricas, área superficial específica pelo método BET; análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG). Em todas as amostras analisadas a parte mineral foi caracterizada como hidroxiapatita carbonatada. Foi verificado que a morfologia e o tamanho dos cristais são influenciados pelo tipo de secagem e pela adição de gelatina. A razão Ca/P encontrada foi superior a desejada para hidroxiapatita estequiométrica. Através das análises de MEV e MET observa-se a presença de aglomerados, característicos as apatitas. A avaliação da atividade microbiológica das amostras frente à saliva, com impregnação de 0,5, 1,0 e 2,0% em massa de sulfato de gentamicina obteve-se a contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) igual a zero, sendo que nas amostras com 0,25% em massa do mesmo antibiótico houve uma grande diminuição no crescimento de colônias, porém apenas na amostra de HA:Gel seca em estufa, a contagem de UFC, permaneceu igual a zero. Os resultados das análises microbiológicas comprovam a ação inibidora do antibiótico quando impregnados a hidroxiapatita.

Palavras-chave: biomateriais, hidroxiapatita, gelatina, sulfato de gentamicina, ensaios microbiológicos

ABSTRACT

Several studies have demonstrated that hydroxyapatite outstands amongst bioceramics, since it presents excellent biocompatibility with human bone mineral phase, stoichiometric formula ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), with Ca/P ratio equal 1,67. It also has the capability of bonding chemically with the tissue, which makes it a bioactive material. Despite the structure and properties of bone tissue representing one of the major fields of study, nowadays the interest is in the possibility of incorporating drugs to such biomaterials. In this work, HA and HA:Gel composites were prepared through the precipitation method, which consisted of the mixture of a $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (2 mol.L^{-1}) solution to a H_3PO_4 ($1,2 \text{ mol.L}^{-1}$) solution, in constant agitation, heating and pH control. The precipitate obtained were put to age for a day and later one part of them was dried in oven at 100°C and another part lyophilized for 48 hours. Powders were then sieved, calcined and had gentamicin sulfate ($\text{C}_{21}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_7 \cdot 2,5\text{H}_2\text{SO}_4$) added to them in 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0% in mass concentrations. These powders were characterized through: infrared absorption spectroscopy, X-ray diffractometry, scanning electronic microscopy (SEM), transmission electronic microscopy (TEM), granulometric analyses, specific superficial area by the BET method, differential thermal analysis (DTA) and thermogravimetry (TG). In all samples analyzed, the mineral part was characterized as carbonated hydroxyapatite. It was observed that the morphology and crystal size are influenced by the drying method and gelatin addition. The Ca/P ratio found was above the desired one for the stoichiometric hydroxyapatite. Through the SEM and TEM analysis, the presence of agglomerates, characteristic to apatites was noticed. The samples microbiological activity evaluation with saliva, with 0,5, 1,0 e 2,0% gentamicin sulfate in mass resulted in UFC equal zero, and samples with 0,25% of the same drug in mass presented sharp decrease in the colonies development, however, only the HA:Gel dried in oven, the UFC remained equal zero. Microbiological analysis results confirm the antibiotic inhibitor action when impregnating the hydroxyapatite.

Key-words: biomaterials, hydroxyapatite, gelatin, gentamicin sulfate, microbiological analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aplicação dos biomateriais.....	22
Figura 2: Organização estrutural do osso.....	26
Figura 3: Fórmula estrutural da gentamicina.....	37
Figura 4: Estrutura do cristal de HA.....	40
Figura 5: Representação esquemática das estruturas de colágeno..	46
Figura 6: Organograma dos materiais e métodos utilizados.....	53
Figura 7: Pó seco.....	55
Figura 8: Desaglomeração do pó em almofariz de ágata.....	55
Figura 9: Etapas dos ensaios microbiológicos.....	58
Figura 10: Contagem UFC/mL(software Image Pro-Plus 4.5).....	59
Figura 11: Esquema dos componentes do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	72
Figura 12: Fotomicrografia obtida por MET da amostra HA.....	74
Figura 13: Fotomicrografia obtida por MET da amostra HA:Gel.....	75
Figura 14: Gráficos de distribuição granulométrica das amostras: a) HA.P.E.V. , b) HA.P.L.V. , c) HA.Gel.P.E.V. e d) HA.Gel.P.L.V.....	77
Figura 15: Curvas representativas de TG e DTA obtidas sobre o pó de HA.P.E.V.....	78
Figura 16: Curvas representativas de TG e DTA obtidas sobre o pó de HA.Gel.P.E.V.....	78
Figura 17: Resultados dos espectros de IV relativos às amostras não calcinadas de HA e HA:Gel.....	80
Figura 18: Resultados dos espectros de IV relativos às amostras HA seca em estufa e liofilizadas após a calcinação.....	82
Figura 19: Resultado dos espectros de infravermelho das amostras com 1% de gentamicina incorporada.....	83

Figura 20: Resultados de IV das amostras após impregnação com gentamicina.....	84
Figura 21: Difratoograma de raios X efetuado das amostras HA.P.E.V., H.A.P.L.V.com e sem calcinação a 700 °C.....	85
Figura 22: Difratoograma de raios X efetuado nas amostras HA:Gel com e sem calcinação.Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA liofilizados e calcinados, sem incorporação de gentamicina (L), e com incorporação de gentamicina (B) 1% (F) 0,5% (H) 2,0.....	86
Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA.P.E.700 e HA:Gel. E.HA:Gel700.....	89
Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA secos em estufa e calcinados, sem incorporação de gentamicina HA.P.E., com incorporação de gentamicina P.E.x% Gent., sendo x: (a) 1% (b) 0,5% e (c) 2,0%.....	90
Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA liofilizados e calcinados, sem incorporação de gentamicina (a), e com incorporação de gentamicina, P.E.x% Gent, sendo x: (b) 1%, (c) 0,5% e (d) 2,0%.....	91
Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA:Gel, secos em estufa e calcinados , sem incorporação de gentamicina (a) e (b) com incorporação de 1% em massa de gentamicina, P.E.1,0% Gent.	92
Figura 27 : Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA:Gel liofilizados e calcinados, sem incorporação de gentamicina (a) e b) com incorporação de 1% em massa de gentamicina, P.E.1,0% Gent.....	92
Figura 28 : Gráfico de EDS da amostra HA. P. L. 2,0%GENT.....	94
Figura 29: Átomos identificados na amostra HÁ. P. L. 2,0%GENT (MEV-EDS).....	95
Figura 30: Controle positivo e controle negativo das amostras de saliva coletadas na etapa um.....	97
Figura 31: Resultado das amostras biológicas de HA secas em estufa e calcinadas, sem impregnação de gentamicina (a) e com x% de gentamicina impregnada sendo x: b) 0,5, c) 1,0 e d) 2.....	98

Figura 32: Resultado das amostras biológicas de HA liofilizadas e calcinadas , sem impregnação de gentamicina (a) e com x% de gentamicina impregnada sendo x: b) 0,5, c) 1,0 e d) 2.....	99
Figura 33: Resultado das amostras biológicas de HA:Gel, secas em estufa e calcinadas, sem impregnação de gentamicina (a) e com incorporação de 1,0% de gentamicina (b).....	100
Figura 34: Resultado das amostras biológicas de HA:Gel, liofilizadas e calcinadas , sem impregnação de gentamicina (a) e com incorporação de 1,0% de gentamicina (b).....	100
Figura 35: Controle positivo e controle negativo das amostras de saliva coletadas na etapa dois.....	102
Figura 36: Resultado das amostras biológicas de HA secas em estufa e calcinadas com incorporação de gentamicina (a) e sem incorporação de gentamicina (b).....	103
Figura 37: Resultado das amostras biológicas de HA:Gel, secas em estufa e calcinadas com incorporação de gentamicina (a) e sem incorporação de gentamicina (b).....	104
Figura 38: Resultado das amostras biológicas de HA:Gel, liofilizadas e calcinadas com incorporação de gentamicina (a) e sem incorporação de gentamicina (b).....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das biocerâmicas.....	24
Tabela 2: Relação dos aminoglicosídeos.....	36
Tabela 3: Aplicações biomédicas do colágeno.....	48
Tabela 4: Código dos pós obtidos antes da calcinação.....	59
Tabela 5: Código dos pós após a calcinação a 700 °C.....	60
Tabela 6: Código das amostras secas em estufa e calcinadas após impregnação com massa de sulfato de gentamicina.....	60
Tabela 7: Código das amostras liofilizadas e calcinadas após impregnação com massa de sulfato de gentamicina.....	60
Tabela 8: Resultado da distribuição granulométrica dos pós não calcinados de HA.....	76
Tabela 9: Resultados de BET das amostras de HA e HA:Gel calcinadas.....	88
Tabela 10: Resultados dos átomos identificados no (MEV-EDS).....	93
Tabela 11 : Contagens em triplicata (24/ 48 horas) do tubo um dos pós calcinados de HA e HA:Gel e controle, sem impregnação de gentamicina e com impregnação de gentamicina.....	96
Tabela 12 : Contagens em triplicata (24/ 48 horas) do tubo dois dos pós calcinados de HA e HA:Gel e controle, sem impregnação de gentamicina e com impregnação de 0,25% em massa de gentamicina	10
	1

LISTA DE SIGLAS

Ca/P	: Razão molar entre cálcio e fósforo
Å	: Unidade de Angstrom
DRX	: Difração de raios X
2	: Posição do pico de Bragg
BHI	: Brain Heart Infusion
BET	: Método utilizado na obtenção da área superficial específica
IVTF	: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
JCPDS	: Joint Committee on Powder Diffraction Standards
EDS	: Sistema de energia dispersivo
F	: Frequência
DTA	: Análise térmica diferencial
IV	: Infravermelho
TG	: Análise termogravimétrica
UHV	: Ultravácuo
λ	: Lambda
θ	: Teta
HÁ	: Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio aquoso
HA:Gel	: Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 10g.L ⁻¹
SBF	: Simulated Body Fluid
TCP	: Fosfato tricálcico
UFC	: Unidade formadora de colônia

LIMAC	: Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos
J- HA. P. E.	: Hidroxiapatita pura seca em estufa
A-HA. P. E.1% Gent.	: Hidroxiapatita pura seca em estufa com impregnação de 1% em massa de sulfato de gentamicina
E- HA. P.E. 0,5%Gent.	: Hidroxiapatita pura seca em estufa com impregnação de 0,5 % em massa de sulfato de gentamicina
G-HA. P. E. 2,0%Gent.	: Hidroxiapatita pura seca em estufa com impregnação de 2,0 % em massa de sulfato de gentamicina
L- HA. P. L	: Hidroxiapatita pura liofilizada
B- HA. P.L. 1% Gent.	: Hidroxiapatita pura liofilizada com impregnação de 1,0 % em massa de sulfato de gentamicina
F- HA. P. L. 0,5% Gent.	: Hidroxiapatita pura liofilizada com impregnação de 0,5 % em massa de sulfato de gentamicina
H-HA. P. L. 2,0%Gent.	: Hidroxiapatita pura liofilizada com impregnação de 2,0 % em massa de sulfato de gentamicina
N- HA.Gel.E.	: Hidroxiapatita com adição de gelatina seca em estufa
C- HA. Gel. E. 1% Gent.	: Hidroxiapatita com adição de gelatina seca em estufa com impregnação de 1,0 % em massa de sulfato de gentamicina
P- HA.Gel. L.	: Hidroxiapatita com adição de gelatina liofilizada
D- HA. Gel. L. 1% Gent.	: Hidroxiapatita com adição de gelatina liofilizada com impregnação de 1,0 % em massa de sulfato de gentamicina
C ⁺	: Controle positivo
C ⁻	: Controle negativo
HA.P.E.U.	: Hidroxiapatita pura seca em estufa submetidas ao ultrassom
HA. P.E.0,25% Gent.	: Hidroxiapatita pura seca em estufa com impregnação de 0,25 % em massa de sulfato de gentamicina
HA.P.L.U.	: Hidroxiapatita pura liofilizada submetida ao ultrassom
HA. P.L.0,25%Gent	: Hidroxiapatita pura liofilizada com impregnação de 0,25 % em massa de sulfato de gentamicina
HA:Gel.E.U.	: Hidroxiapatita com adição de gelatina seca em estufa e submetidas ao ultrassom

HA:Gel.E.0,25% Gent.	: Hidroxiapatita com adição de gelatina seca em estufa com impregnação de 0,25 % em massa de sulfato de gentamicina
HA. Gel.L.U.	: Hidroxiapatita com adição de gelatina liofilizada e submetida ao ultrassom
HA. Gel.L.0,25% Gent.	: Hidroxiapatita com adição de gelatina liofilizada com impregnação de 0,25 % em massa de sulfato de gentamicina
TTCP	: Fosfato tetracálcico
DCPD	: Fosfato dicálcico dihidratado
DCP	: Hidrogenofosfato de cálcio
DTA	: Análise térmica diferencial
Hz	: Hertz
SBF	: Fluido corporal simulado
ICDD	: International Center For Diffraction Data
ACP	: Fosfato de cálcio amorfo
CPC	: Fosfato de cálcio
SCD	: Sulfato de cálcio diidratado
DSC	: Calorimetria exploratória diferencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 BIOMATERIAIS.....	21
2.2 TECIDO ÓSSEO.....	25
2.3 FOSFATOS DE CÁLCIO E FÁRMACOS.....	29
2.4 ANTIBIÓTICOS.....	34
2.4.1 Sulfato de Gentamicina.....	37
2.5 HIDROXIAPATITA.....	39
2.6 PROTEÍNAS.....	44
2.6.1 Gelatina.....	44
2.6.2 Colágeno.....	45
2.7 - H A – COLÁGENO.....	50
2.8 Liofilização.....	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 SÍNTESE DA HA.....	53
3.1.1 Síntese de HA:Gel.....	54
3.1.2 Secagem e calcinação.....	54
3.1.3 Impregnação de sulfato de gentamicina nas amostras de HA e HA:Gel.....	56
3.1.4 Análises Microbiológicas.....	57
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS.....	61
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	61
3.2.2 Distribuição de Tamanhos de Partículas.....	62
3.2.3 Análise Térmica.....	63

3.2.4 Difractometria de Raios X.....	64
3.2.5 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho.....	66
3.2.6 Análise de área superficial BET.....	68
3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	70
3.2.8 Sistema de Energia Dispersiva (EDS).....	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	74
4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO(MET).....	74
4.2 ANÁLISES GRANULOMÉTRICAS.....	75
4.3ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) E TERMOGRAVIMETRICA (TG).....	77
4.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	80
4.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	85
4.6 BET.....	88
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	89
4.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	96
4.8.1 Etapa um.....	96
4.8.2 Etapa dois.....	101
5. CONCLUSÕES.....	106
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	107
7 REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo desenvolvimento de novos materiais utilizados em enxertos com a função de restaurar, remodelar ou mesmo reforçar estruturas ósseas cresceu nos últimos anos. O uso desses materiais é bastante comum em obturações, após a curetagem de lesões cavitárias de tumores ósseos benignos e malignos, sendo uma alternativa para o reparo e substituição de tecidos vitimados por traumas ou patogenias. Além disso, existe uma preocupação em desenvolver terapias que visem melhorar e garantir a qualidade de vida, pois, entre os diversos males que afetam a estrutura óssea, a osteoporose e a perda de massa óssea têm sido intensamente estudadas devido a seus efeitos devastadores.

A ciência dos materiais vem ocupando lugar de destaque, para atender a demanda da indústria moderna relacionados aos problemas de estrutura óssea, decorrentes de processos inflamatórios, acidentes ou osteoporose.

A ausência de um substituto biológico que atenda perfeitamente as necessidades de enxertia influenciou no desenvolvimento de biomateriais sintéticos para eventuais substituições ósseas. (CANO et al,1999).

A introdução desses materiais sintéticos no corpo aparece como um caminho para minimizar desconfortos e melhorar a qualidade e a expectativa de vida.

Dessa forma, torna-se necessário a união de várias áreas do conhecimento, destacando-se as Ciências Biológicas, Ciências Médicas e Veterinária, concomitante com o avanço da Ciência dos Materiais, utilizando os biomateriais em suas técnicas.

Os biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo, a não estimular uma

resposta imunológica dos mesmos, isto caracteriza a biocompatibilidade.(PARK, 1979).

Dentre os materiais sintéticos usados para biorreparação do tecido ósseo, destacam-se as cerâmicas, também conhecidas como biocerâmicas, apresentam-se na forma de pós, revestimentos ou próteses usadas para reparo, aumento ou substituição de tecidos doentes ou danificados, como ossos, articulações e dentes. (ANDRADE, 2006).

As matérias-primas utilizadas na fabricação de biocerâmicas podem ser naturais ou produtos químicos inorgânicos sintetizados por uma rota específica. No caso de produtos para aplicação biomédica, a necessidade de elevada pureza e controle, determina, em geral, o uso de processo de síntese específico ou de seleção e beneficiamento da matéria-prima. (ORÉFICE, 2006; EISENBERGER, 1996).

São exemplos de biocerâmicas a alumina densa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), a zircônia (ZrO_2), o dióxido de titânio (TiO_2), fosfatos de cálcio, sendo a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) mais estudada, e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato de cálcio.

Para obtenção de biomateriais, tem-se utilizado os fosfatos de cálcio, que são materiais cerâmicos com relação Ca/P variadas, conhecidos como apatitas. Desta forma, os fosfatos de cálcio que possuem uma relação Ca/P variando de 0.5 a 2.0, podem ser sintetizados por vários métodos, como o da precipitação a partir de soluções contendo íons cálcio e fosfato, sob condições alcalinas ou ácidas. (LEGEROS,1991).

A hidroxiapatita (HA), vem se destacando entre as biocerâmicas, pois apresenta excelente biocompatibilidade com a fase mineral do osso humano, de fórmula estequiométrica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), com razão Ca/P igual a 1,67 tendo a

capacidade de unir-se quimicamente com o tecido, o que a torna um material bioativo. Seu uso para finalidades clínicas se deve primeiramente à alta compatibilidade e osteointegração do material. A hidroxiapatita apresenta uma baixa toxicidade; boas propriedades mecânicas nas condições fisiológicas; porosidade que permite um ancoramento das células; baixa imunogenicidade e bioatividade.

A tendência atual é a utilização desses biomateriais com a incorporação de fármacos (antibióticos) visando a sua liberação controlada em organismos vivos. Portanto, reduzindo o efeito terapêutico da administração no modo convencional e, com a vantagem de liberação da droga diretamente no tecido ósseo danificado, desta maneira, evitando possíveis cirurgias para remoção do material após a liberação total da droga. (OGAWA & PLEPIS, 2002).

Os antibióticos utilizados para tratar infecções bacterianas podem ser classificados de acordo com a sua potência. Sendo que os antibióticos bactericidas destroem as bactérias, enquanto, os antibióticos bacteriostáticos evitam apenas que as bactérias se multipliquem e permitem que o organismo elimine as bactérias resistentes. 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. (BIER, 1984; KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982; MARTINS et al, 1999). Os aminoglicosídeos são antibióticos de amplo uso clínico, em função de sua eficácia contra bacilos gram-negativos e de seu sinergismo positivo com outros antibióticos no tratamento de infecções por agentes gram-positivos.

Ensaio microbiológicos 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 microorganismos que possam se desenvolver no local do reparo. (NASCIMENTO et al, 2007).

Dentro do que foi exposto o propósito deste trabalho foi desenvolver um biomaterial de hidroxiapatita com a incorporação de gentamicina.

Vários métodos são utilizados na síntese da hidroxiapatita, entretanto, nesse trabalho utilizou-se a reação por precipitação em meio aquoso. Este método destaca-se pela sua simplicidade, baixo custo, além da formação da HA cristalina. A precipitação foi realizada na ausência e na presença de gelatina. A secagem do material foi realizada em estufa e liofilizador. Essas variáveis foram estudadas com o objetivo de obter características morfológicas que auxiliem a gentamicina na inibição do crescimento bacteriano após substituição óssea. Para tanto, os testes realizados foram efetuados com a inoculação dos pós obtidos em meio de cultura apropriada (BHI) na presença de saliva humana. Diferentes concentrações de sulfato de gentamicina foram testadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS

Na atualidade nos deparamos com diversos problemas relacionados à saúde, acidentes automobilísticos, aumento da população de idosos e, conseqüentemente, das doenças relacionadas à velhice. Portanto, várias pesquisas estão voltadas à área dos materiais, buscado melhorar suas propriedades físicas, como aquelas observadas quando estes se encontram na forma nanométrica, que possam substituir de forma adequada os ossos danificados. Estes materiais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos onde serão implantados, as quais caracterizam a biocompatibilidade. Os materiais sintéticos utilizados para este fim são chamados de biomateriais e podem ser metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros. (KAMACHI et al, 2000).

Dentre inúmeras definições, entende-se por biomaterial como “Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, 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”. (WILLIAMS, 1987).

Segundo Hench e Wilson, incluem-se dentro das cerâmicas bioativas, as cerâmicas de hidroxiapatita e aos vidros, vitrocerâmicas e materiais compostos com atividades superficiais. Na superfície destes materiais se forma uma capa de carbohidroxiapatita biologicamente ativa, na qual proporciona a união interfacial com o tecido. Esta fase é química e estruturalmente equivalente à fase mineral constituinte do osso. (HENCH & WILSON, 1993).

Devido a distintas propriedades e formas, os biomateriais podem ser aplicados em inúmeras partes do corpo (Figura 1). Grande parte dos "materiais de uso em saúde", conforme definições estão enquadrados como biomateriais: próteses, lentes, enxertos, "stents", cateteres, tubos de circulação extra-corpórea e arcabouços ("scaffolds") empregados na Engenharia de tecidos , entre outros. (SOARES, 2005).

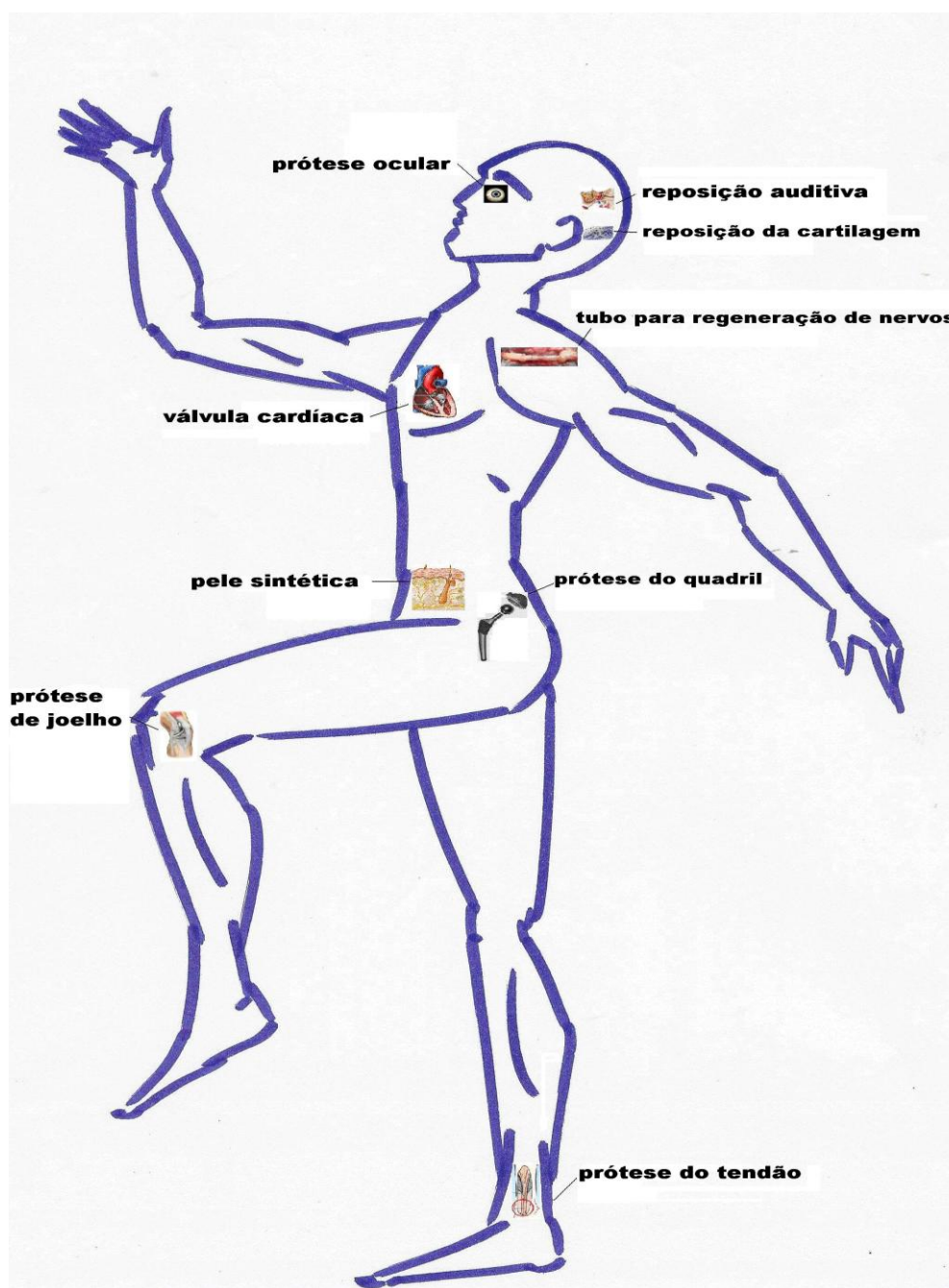


Figura 1: Aplicação dos biomateriais.

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com seu comportamento fisiológico em: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e absorvíveis. (SANTOS, 2002).

Biotoleráveis, materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida por meio da liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais. (SANTOS, 2002).

Bioinerte, quando o material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, o faz em pequenas quantidades. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima, a resposta fagocítica será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após o implante. Em alguns casos esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono. (SANTOS, 2002).

Absorvíveis, materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material do implante. Os principais exemplos desses materiais são os fosfatos tricálcico (TCP), ácido polilático e gesso. (SANTOS, 2002).

Bioativos, materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração). Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio do recobrimento por células ósseas.

(SANTOS, 2002). Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os componentes de fosfato de cálcio. (RIGO et al, 1999).

A utilização de cerâmicas como biomateriais vem sendo relatada desde 1894, quando Dreesman relatou o uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para ossos. Porém, a baixa resistência mecânica e o fato deste material ser absorvido pelo organismo, provocando uma rápida degradação e fragmentação, torna seu uso inviável para implantes ósseos. (KAWACHI et al, 2000).

A década de 1970 marcou o início do uso sistemático de materiais cerâmicos como biocerâmicos (Tabela 1). A alumina densa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) foi à primeira biocerâmica com uso muito difundido neste período, por se apresentar bioinerte e com elevada resistência mecânica. (KAWACHI et al, 2000).

Tabela 1: Classificação das Biocerâmicas. (adaptada de KAWACHI et al, 2000).

Tipo de biocerâmica	Interações com os tecidos	Exemplos
Inertes	Não há interações químicas nem biológicas	Alumina
Porosas	Ocorre o crescimento interno dos tecidos através dos poros	Aluminatos e hidroxiapatita porosos
Bioativas	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatita e vitro-cerâmicas
Reabsorvíveis	As cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos	Gesso e fosfato tricálcico

Para que uma biocerâmica possa ser utilizada em organismos vivos, é necessário apresentar algumas características, tais como: ser biocompatível, isto é, não induzir as respostas teciduais ou imunológicas; não ser tóxico nem

carcinogênico; ser quimicamente estável; ter estabilidade mecânica adequada; ter peso, densidade e forma adequada; ser relativamente barato, reproduzível e de fácil fabricação; ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado com a máxima eficiência. (VULCANI, 2004).

Na literatura encontramos diversas rotas de síntese que tem mostrado uma profunda influência dos métodos de preparação sobre as propriedades das biocerâmicas. Entre estas propriedades, destacam-se, a estequiometria, a estrutura cristalina e a porosidade, para o comportamento biológico de tais materiais. Genericamente, o preparo de uma cerâmica e, portanto, de uma biocerâmica, envolve três etapas fundamentais: preparo do pó; secagem parcial do bloco conformado e aquecimento a altas temperaturas para obtenção do bloco sinterizado.

Atualmente, vem se difundido o uso de cerâmicas, como a zircônia (ZrO_2), o dióxido de titânio (TiO_2), os fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato de cálcio. Dentre estas cerâmicas, o fosfato de cálcio, a hidroxiapatita, com razão Ca/P igual a 1,67, é, sem dúvida a mais estudada para as finalidades clínicas, por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos. (KAWACHI et al, 2000).

2.2 TECIDO ÓSSEO

Essencialmente o osso é considerado como nanocompósito de minerais e proteínas. Os minerais são na maior parte apatitas semelhantes às hidroxiapatitas ($\text{HA} - \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), fluorapatita e apatita-carbonatada.

A organização estrutural do osso, como mostrado na Figura 2, pode ser dividida em: macroestrutura (osso cortical e esponjoso); microestrutura (sistema Harvesiano, ósteons, trabéculas individuais), sub-microestrutura (lamelas);

nanoestrutura (colágeno fibrilar com fase mineral) e sub-nanoestrutura (estrutura molecular dos elementos constituintes, tais como o mineral, o colágeno e as proteínas não-colágenas). Essa estrutura hierarquicamente organizada possui arranjo e orientação de componentes irregulares, contudo aperfeiçoados, produzindo um material heterogêneo e anisotrópico. (RHO et al, 1998).

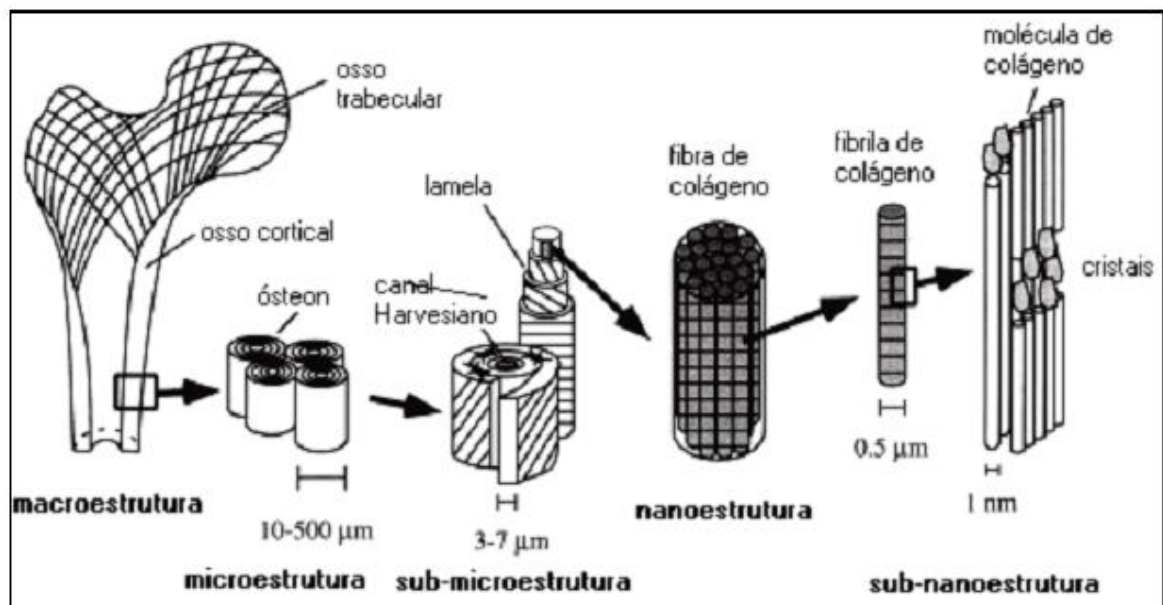


Figura 2: Organização estrutural do osso. (RHO et al, 1998)

Os cristais de apatita se encontram em espaços discretos, dentro das fibrilas de colágeno, portanto limitando o possível crescimento primário dos cristais e forçando-os a serem discretos e descontínuos. Os cristais crescem numa orientação cristalina específica, com o eixo dos cristais aproximadamente paralelos ao eixo de comprimento das fibrilas de colágeno. A dimensão média da fase mineral é de $50 \times 25 \times 3\ \text{nm}^3$. (RHO et al, 1998).

Em geral HA é um componente essencial do osso mineral e em certos casos apatita-carbonatada é o essencial componente do tecido duro, assim como o esmalte dental. Sendo que, a calcificação do tecido ósseo e dental é considerado

biologicamente e quimicamente um depósito de compósitos entre nanocristais de HA e colágeno tipo um. (CHANG, 2003).

A matriz óssea compõe-se de duas partes, uma delas é inorgânica, constituindo cerca de 70% de seu peso seco, sendo composta por íons de cálcio e fósforo, formando os cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e de pequena quantidades de bicarbonatos, citratos, magnésio, sódio e potássio. A outra parte é orgânica, constituída de fibras colágenas (95%) e por pequena quantidade de substância fundamental amorfa (colágeno tipo1). A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. A mineralização consiste na deposição de íons inorgânicos, principalmente o fosfato de cálcio. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O colágeno é principal constituinte do esqueleto, servindo como suporte para os tecidos moles e protegendo os órgãos vitais. Sendo um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. No osso, ela é composta por, aproximadamente 25% de água, 25% de proteínas fibrilares e 50% de sais minerais cristalizados. (TORTORA & GRABOWSKI, 2002).

O osso é altamente especializado sendo caracterizado por sua rigidez e resistência a pressão. Tal dureza resulta da interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz, já que o osso é um grande depósito, sobretudo de íons de cálcio e fosfato. (STEVENS & LOWE, 2000).

Os ossos param de crescer, em comprimento, em torno dos 25 anos de idade. Os processos que afetam o crescimento e a manutenção do osso dependem de ingestão adequada da dieta, de minerais e vitaminas, assim como de níveis suficientes de hormônios. (TORTORA & GRABOWSKI, 2002).

Já o envelhecimento do tecido ósseo ocorre por duas maneiras: a perda da massa óssea, que começa após os 30 anos na mulher e geralmente aos 60 anos nos homens, essa perda de cálcio dos ossos é uma das causas da osteoporose. O segundo processo, a fragilidade, resulta da diminuição da síntese protéica, o que reduz a porção orgânica da matriz óssea, sobretudo fibras colágenas, que dá ao osso sua força e tensão. (TORTORA & GRABOWSKI, 2002).

O “esqueleto” do embrião humano é composto por membranas de tecido conjuntivo fibroso, formadas por condensação de tecido conjuntivo embrionário, que formam o molde para a ossificação chamada de intramembranosa, ou por segmentos de cartilagem, dando origem à ossificação endocondral. (TORTORA & GRABOWSKI, 2002).

Em relação à histologia do tecido ósseo pode-se dizer que há quatro tipos de células ósseas: as células osteogênicas ou osteoprogenitoras, os osteoblastos, osteócitos e os osteoclastos. (TORTORA & GRABOWSKI, 2002).

A formação do osso ocorre de três maneiras distintas: osteogênese, osteocondução e osteoindução. (GIMENES, 2001).

A parte do osso perdida ou lesada pode ser substituída por outros tecidos, denominados enxertos que podem se classificar em: enxertos ósseos autólogos ou autoenxertos; aloenxerto ou homoenxerto; os xenoenxertos ou heteroenxerto e os aloplastos. (CORREIA & ALVES, 2002).

Enxertos ósseos autólogos ou autoenxertos ocorrem quando o osso é transferido de um lugar a outro, no mesmo indivíduo, seu emprego, porém trazem alguns problemas como a limitação do material, lesão ou enfraquecimento de outras estruturas ósseas e riscos inerentes a este tipo de intervenção. (ROSSI et al, 2001).

Aloenxerto ou homoenxerto utiliza osso liofilizado desmineralizado de origem humana, neste caso encontra-se dificuldade de esterilização e estocagem.

Os xenoenxertos ou heteroenxerto neste caso tem-se uma matriz mineral óssea purificada de origem bovina, sendo semelhante ao osso humano no que concerne à sua superfície interna, porosidade, tamanho do cristal e relação cálcio-fósforo. (CORREIA & ALVES, 2002).

Os aloplastos são biologicamente inertes, usados para aumentar ou reconstruir partes do organismo, cujo desenvolvimento surgiu em decorrência da ausência de um substituto biológico que atenda às necessidades.

As biocerâmicas são muito utilizadas, pois não induzem qualquer reação imunológica ou tóxica, bem diferente de alguns materiais que têm origem orgânica. Não apresentam riscos de transmissão de patologias infecto-contagiosa nem de degradação protéica, em razão de suas características sintéticas e por apresentarem alta pureza em decorrência de seu processo de obtenção com controle rígido e sistemático, de acordo com os padrões exigidos. (GROSS et al, 1997).

2.3 Fosfatos de Cálcio e Fármacos

A idéia de liberação controlada de substâncias biologicamente ativas já é utilizada desde a década de 50, sendo que anteriormente não se conheciam materiais que pudessem liberar moléculas de alto peso molecular, tais como peptídeos e proteínas, sem induzir inflamações. (FOLKMAN, 1990).

Na busca de materiais para regeneração e reparação óssea entra em campo as cerâmicas conhecidas ao longo de alguns anos.

Inicialmente, o maior interesse está nas cerâmicas biologicamente inertes como alumina e zircônia, devido a sua excelente resistência a corrosão, sua alta resistência mecânica, seu baixo atrito e desgaste. As cerâmicas bioativas, mais concretamente, os fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), o fosfato tricálcico β (β -TCP, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), se introduziram como substitutos ósseos nos anos setenta. Uma das razões é seu bom comportamento biológico e sua similaridade com a fase mineral do osso, que é uma hidroxiapatita carbonatada. Sua aplicabilidade está relacionada a alguns problemas de adaptação e fixação na cavidade onde serão implantados, tais, como: métodos de fabricação dessas cerâmicas e sinterização à alta temperatura. Esses dois fatores representam um inconveniente importante para este tipo de material, visto que, estão relacionados ao seu tamanho e forma, que devem ser definidos antes da implantação.

No ano de 1983, Brown e Chow publicaram o primeiro estudo sobre um cimento de fosfato de cálcio (CPC), que considerava a possibilidade de obter HA em forma monolítica a temperatura ambiente e corporal, mediante uma reação do tipo cimento (BROW, 1983). Ao misturar dois precursores de fosfatos de cálcio, forma-se uma fase básica, o fosfato tetracálcico (TTCP, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) e uma fase ácida, o fosfato dicálcico dihidratado (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o hidrogenofosfato de cálcio (DCP, CaHPO_4), com uma solução aquosa obtiveram uma pasta rígida, com o tempo a temperatura ambiente.

Em geral, se pode decidir que os CPC consistem na mistura de uma fase em pó, formados por um ou mais fosfatos de cálcio, com uma fase líquida (água ou uma solução aquosa), dando lugar a uma pasta rígida, formando um corpo sólido. (BOHNER, 1997).

Para incorporação de um fármaco em CPC, devem ser considerados alguns aspectos: verificação de adição do fármaco, que se pode incorporar na fase líquida e na fase sólida do cimento, pois isso interfere na reação do precipitado, modificando suas propriedades físico-químicas, tanto em nível de precipitação e endurecimento, quanto ao comportamento reológico. Depois, é necessário caracterizar a cinética de liberação do fármaco *in vitro*, para em seguida, estudar o efeito desse material para atuar como veículo de liberação do fármaco *in vivo*, ficando por último sua aplicação clínica.

Assim, os estudos podem ser classificados como:

A) Estudos *in vitro* – efeito da incorporação de antibióticos nas propriedades físico químicas dos cimentos; estudo da cinética de liberação de antibióticos *in vitro*. (BOHNER, 2000).

B) Estudos *in vivo* – análises de liberação de antibióticos *in vivo*. (LEE, 1999).

Devido às dificuldades experimentais e éticas inerentes aos procedimentos *in vivo*, vários procedimentos *in vitro* foram propostos para testar a bioatividade de materiais sintéticos. Os estudos mais antigos foram realizados por Hench e colaboradores em 1993, os quais mostraram o crescimento da camada HA, *in vitro*, em vidros que liberavam íons cálcio e fósforo para o meio, imergindo-os em uma solução de água destilada tamponada com tris-hidroximetil-amino-metano e HCl (tampão tris) a um pH de 7,25 a 37° C. Entretanto, quando outros tipos de vidros, que não continham cálcio e fósforo em sua composição original, mas que apresentavam bioatividade *in vivo*, eram imersos no tampão tris, não ocorria o crescimento da camada de HA. (DOMINGUES, 2006).

Dentre vários métodos utilizados para a aplicação de recobrimentos de HA, o método denominado biomimético, introduzido por Abe, é uma das técnicas mais promissoras para produção de biomateriais sob condições ambiente. Este método consiste na imersão do substrato, a ser recoberto, em solução sintética (SBF- Simulated Body Fluid) de composição química e pH semelhante ao plasma sanguíneo e temperatura similar à do corpo humano. (ABE, 1990). Devido a essas condições é possível recobrir materiais porosos, e também materiais sensíveis a temperaturas, como é o caso dos polímeros. Além disso, com esta técnica podem-se recobrir implantes com diferentes fases de fosfatos de cálcio, as quais possuem características benéficas para formação óssea. (GROSS, 1997).

Atualmente, o procedimento mais utilizado para teste *in vitro* consiste em imergir o material a ser testado em solução SBF por períodos de tempo entre 3 h e 15 dias e, posteriormente, através de análises de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e de microscopia eletrônica de varredura utilizando a técnica de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS), são utilizadas para comprovar a formação de HA. (DOMINGUES, 2006).

Desde meados dos anos noventa, diversos estudos apontam que se pode utilizar tanto CPC comercial, como formulações desenvolvidas experimentalmente, como veículos de liberação de fármacos. Em geral, nas pesquisas destacam-se os antibióticos, por sua ampla aplicação, tanto no campo de prevenção de infecções ocasionados durante cirurgias, como no tratamento de infecções ósseas, também se tem realizado estudos com outros medicamentos, como antiinflamatórios, fármacos contra o câncer, incluindo hormônios. (BOHNER, 2000).

No campo de restauração do tecido ósseo, os fosfatos de cálcio apresentam grande interesse e em particular a hidroxiapatita como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, por sua

semelhança com a hidroxicarbonatoapatita presente na fase mineral de ossos e dentes. (LEGEROS, 1991). O principal atrativo biológico desses materiais inclui a ausência de toxicidade local e sistêmica, a ausência de resposta inflamatória e corpo estranho; a capacidade de ligar-se diretamente com tecido ósseo, sua osteocondutividade, assim como sua biocompatibilidade. Contudo, apesar das grandes vantagens, a hidroxiapatita demonstra uma lenta reatividade *in vitro*, assim como uma lenta formação do tecido ósseo *in vivo*.

A introdução do fármaco no cimento pode afetar o seu comportamento reológico. Neste sentido tem se observado a introdução de vancomicina acelera o processo de endurecimento, a tobramicina retarda, enquanto que a cefalixina monohidratada não o modifica. (GITELIS, 2002).

A velocidade de liberação do fármaco é uma propriedade crítica de todo processo que venha a ser utilizado como sistema de liberação. Em ensaios *in vitro*, a caracterização de sua cinética de liberação se pode realizar, geralmente em soluções tamponadas de fosfato a pH 7,4 em fluido corporal simulado (SBF) e a quantificação do fármaco realiza-se por métodos microbiológicos e espectrofotométricos.

Assim mesmo, é importante considerar o estudo de liberação, isto é, contando que a solução onde se libera o fármaco, se renova ou não, depois de cada medida. Nesse sentido, estudos *in vitro* de liberação de tobramicina de uma matriz de SCD, demonstraram que a solução é renovada, mais de 50% do fármaco se libera nas primeiras 24 horas, em caso contrário a liberação de 50% de tobramicina se alcança em seis dias de ensaio. (MCLAREN et al, 2002).

Por outra parte, a utilização desses sistemas de liberação “*in vivo*”, implica na esterilização do material. Neste sentido, Dacquet et al, (1990) realizaram um

estudo da influência no processo de esterilização dos cimentos com radiação γ , na liberação do fármaco. (DACQUET et al, 1990).

2.4 ANTIBIÓTICOS

O aumento de infecções ósseas causada por *Staphylococcus Aureus*, agente mais freqüente causador da osteomielite crônica, assim como o aumento da resistência a distintos microorganismos, eleva a busca de diferentes combinações de HA/antibióticos.

Geralmente, os antibióticos têm sido designados, para serem administrados diariamente no organismo, portanto, sozinhos eles devem manter sua atividade durante algumas horas. Contudo, quando são introduzidos no organismo junto com o implante, os antibióticos devem permanecer no corpo a 37°C durante alguns dias/semanas e sua atividade deve persistir durante o tratamento. Nesse sentido é importante conhecer a estabilidade térmica dos fármacos durante os ensaios de liberação.

Os resultados obtidos mostram que cefalosporinas e penicilinas (principalmente o sal sódico e a amoxilina), são muito instáveis à 37°C e sua atividade antibacteriana diminui em 90% depois de uma semana.

Dentre os antibióticos, encontram-se a classe dos aminoglicosídeos, de amplo uso clínico, sendo direcionado para tratar infecções causadas por microorganismos gram-negativos, importantes agentes etiológicos da septicemia. (BERTINO et al, 1994). Os aminoglicosídeos (sulfatos de gentamicina, tobramicina e amikacina) apresentam a melhor estabilidade térmica e suas propriedades

antibacterianas não se modificam ao permanecer três semanas em solução a 37 °C. Por outro lado, o baixo índice terapêutico desta classe e reações adversas relacionadas à nefro e ototoxicidade são fatores limitantes de sua utilização. (TAVARES, 1999).

Estudos que culminaram com o descobrimento desta nova classe de antibióticos iniciaram-se em 1939, no Departamento de Microbiologia da Unidade de Agricultura Experimental da Universidade de Rutgers, de New Jersey, nos Estados Unidos. Em 1943, após examinar vários actinomicetos de solo Waksman e colaboradores, isolaram uma cepa de *Streptomyces griseus*, que produzia uma substância que inibia o crescimento do bacilo da tuberculose e de diversos microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos, e a partir daí, em 1944, a estreptomicina foi isolada. (TAVARES, 1999).

Depois desses estudos uma série de substâncias derivadas dos actinomicetos, com potencial antibacteriano, foram descobertas, assim como os aminoglicosídeos semi-sintéticos, amicacina e netilmicina derivados da canamicina e sisomicina. (GILBERT, 1995). Pode-se verificar na Tabela 2 a origem e o ano de descoberta dos aminoglicosídeos.

Tabela 2: Relação dos aminoglicosídeos. (Adaptada de OLIVEIRA et al, 2006).

Nome	Gênero	Ano de descoberta
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	1944
Neomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1957
Paromomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	1959
Gentamicin	<i>Micromonospora purpúrea</i>	1963
Tobramycin	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	1968
Amikacin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1972
Netilmicin	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1975
Spectinomycin	<i>Streptomyces spectabilis</i>	1962
Sisomicin	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1970
Dibekacin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1971
Isepamicin	<i>Micromonospora purpúrea</i>	1978

Segundo Oliveira e colaboradores (2006), o nome aminoglicosídeo se deve ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol, que habitualmente está em posição central. Portanto, o nome da substância tem relação com a sua origem. Aqueles que terminam com mycin são derivados direta ou indiretamente de *Streptomyces* e aqueles que terminam com micin são derivados direta ou indiretamente de *Micromonospora*.

Outros antibióticos (quinolona, glicopéptidos, fusidato de sódio e em menor grau, a amoxicilina trihidrato) mantêm uma atividade parcial (40 - 60%) depois de três semanas nestas condições. (GITELIS, 2002; VARLET, 1983).

Os resultados obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo*, indicam que HA associado aos antibióticos pode representar uma boa alternativa no tratamento de infecções ósseas. A facilidade de preparação, a modificação das propriedades da

matriz combinada com outro componente, à capacidade para adaptar-se a cavidade óssea, permitindo que o fármaco se libere localmente na zona infectada facilitando a regeneração óssea, é entre outras, suas principais características. (MOUSSET, 1995).

2.4.1 Sulfato de Gentamicina

Entre os vários antibióticos utilizados, a gentamicina e a fucidina são considerados os antibióticos com as melhores características farmacocinéticas. (TADIC, 2004).

O sulfato de gentamicina (Figura 3) é um complexo antibiótico que se apresenta na forma de pó, com coloração que varia de branco a amarelado, produzidos por actinomicetos do gênero *Micromonospora* e classificado entre os antibióticos aminoglicosídeos. O tratamento de infecções graves, devido aos microorganismos Gram-negativo, constitui o principal campo de aplicação terapêutica. (LOURENÇO, 2006).

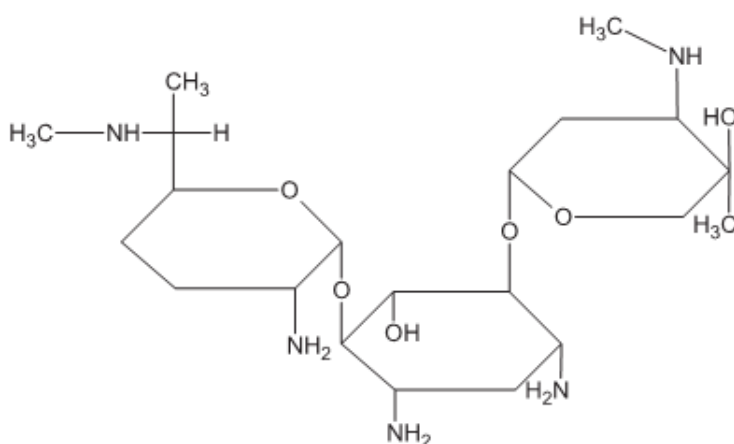


Figura 3: Fórmula estrutural da gentamicina. (STIGTER, 2004).

Em 1983, Varlet afirmou que a gentamicina é o antibiótico com as melhores características de manipulação para combinação com gesso. (VARLET, 1983). A incorporação de gentamicina em biomateriais é vantajosa por minimizar o desconforto para o paciente, visto que a droga é liberada diretamente no sítio de ação.

As concentrações terapêuticas de gentamicina em seres humanos foram estabelecidas por Noone e Barza em valores de 5-10 µg/mL. Concentrações superiores a 10 µg/mL podem ser prejudiciais, causar efeitos nefrotóxicos. (TADIC et al, 2004).

De acordo com CANO (1999), é detectada importante liberação de gentamicina durante as primeiras 24 horas que seguem a intervenção cirúrgica. A partir daí a liberação acontece gradativamente até o 19º dia, em que esta desaparece do plasma. O tempo de liberação total da gentamicina está diretamente ligado à concentração desta nas pastilhas de gesso, entre outros fatores como área, porosidade e permeabilidade do material. (CANO et al, 1999).

Quanto ao efeito nefrotóxico da gentamicina, o autor descartou a existência dos efeitos tóxicos das substâncias utilizadas, através de determinações de uréia, pH, densidade urinária e sedimento urinário entre os grupos observados. (CANO et al, 1999).

Os resultados obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo*, indicam que HA associado aos antibióticos pode representar uma boa alternativa no tratamento de infecções ósseas. A facilidade de preparação, a modificação das propriedades da matriz combinada com outro componente, à capacidade para adaptar-se a cavidade óssea, permitindo que o fármaco se libere localmente na zona infectada facilitando a

regeneração óssea, são entre outras, suas principais características. (MOUSSET, 1995).

2.5 HIDROXIAPATITA

No ano de 1983, Brown e Chow, publicaram sobre o cimento fosfato de cálcio (CPC), que supunha a possibilidade de obter HA em forma de material a temperatura ambiente corporal mediante reação do tipo cimento.

Entre os biomateriais a hidroxiapatita, vem se destacando por sua larga aplicação no campo da medicina e da odontologia, como um substituto ósseo e dentário para implantes. De forma mais simples podemos dizer que o corpo humano é constituído por três componentes básicos: água, colágeno e hidroxiapatita, sua fórmula estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67. A estrutura da hidroxiapatita é formada por grupos fosfatos, onde o fósforo se liga ao oxigênio, sendo chamado de grupo hidroxila. Esses grupos, juntamente com o cálcio, formam um arranjo em forma hexagonal, pertencente ao grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$ conforme a Figura 4. Deformações na rede são causadas pelo deslocamento das hidroxilas formando a estrutura monoclínica da hidroxiapatita, um arranjo mais fechado, com grupo espacial $\text{P21}/\text{b}$. (SILVA, 2006).

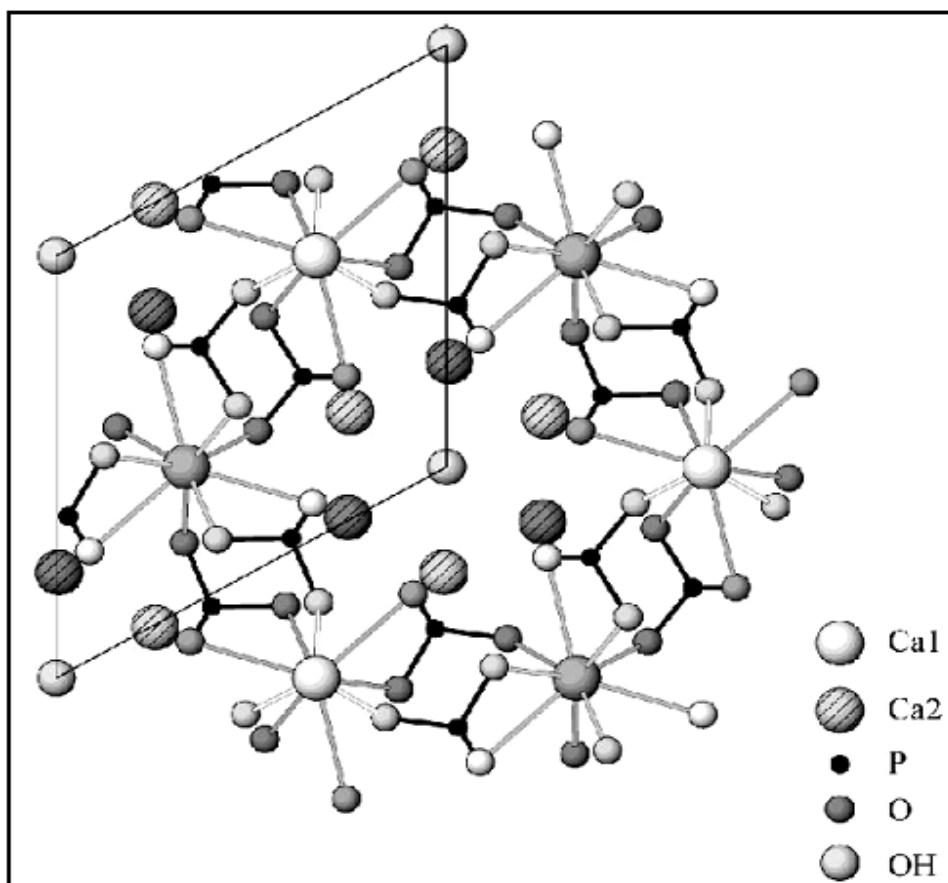


Figura 4: Estrutura do cristal de HA.(IVANOVA et al, 2001).

A composição química da hidroxiapatita é similar à dos ossos e dentes, sendo muito utilizada para finalidades clínicas, devido à sua alta compatibilidade e osteointegração, apresentando ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de resposta a corpos estranhos ou inflamatórios e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro. (GARTNER & HIATT, 2003). Representando a fase mineral dos ossos e dos dentes, sendo responsável por fornecer estabilidade estrutural ao corpo, protegendo órgãos vitais como pulmões e coração, funcionando como um depósito regulador de íons. Tal fase representa aproximadamente 5% do peso total de um indivíduo adulto.

De Jong foi o primeiro a observar a semelhança entre os padrões de difração de raios X da fase mineral dos ossos e da hidroxiapatita, em 1926. (KAWACHI et al, 2000).

Essa semelhança induz o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondução), estabelecendo ligações de natureza química entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo (bioatividade), permitindo assim a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, sendo que, com o passar do tempo, as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea. (SALEH et al, 2004).

A superfície da hidroxiapatita 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.

Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 ou 5 anos de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação. (KAWACHI et al, 2000).

Pode-se obter hidroxiapatita a partir de ossos humanos e de outra espécie de animal; por transformações de materiais naturais como nos esqueletos minerais dos corais e equinodermos; ou pode ser sintetizada artificialmente. (SALEH et al, 2004).

Entretanto, a hidroxiapatita pode apresentar-se em diferentes formas, porosidade, tamanho de cristal, cristalinidade, defeitos cristalinos, entre outros, o que interfere na solubilidade e capacidade de absorção do material pelo organismo. Assim, é possível obter-se hidroxiapatita desde praticamente não absorvível até totalmente absorvível em meio fisiológico em função dos diferentes métodos e condições de obtenção.

O método de síntese adotado para obtenção de hidroxiapatita ou o seu tratamento posterior pode levar ao aparecimento ou não de outras fases de compostos de fosfatos de cálcio, o que poderia comprometer algumas características da hidroxiapatita, como a osteocondução, ou comprometer a integridade e eficiência mecânica do material em função de sua solubilização. (SALEH et al, 2004).

Os principais métodos de obtenção da hidroxiapatita são por precipitação, por via hidrotermal e por via térmica. (SECKLER et al, 1998).

Os métodos baseados na precipitação da hidroxiapatita consistem basicamente em misturar fontes de íons cálcio e fosfato em meio aquoso conveniente. O pH é controlado durante a síntese mediante fluxo de NH_3 gasoso, ou adicionando soluções aquosas de NH_4OH , NaOH e KOH . Para valores de $\text{pH} > 7$ a primeira fase a se cristalizar é ACP – fosfato de cálcio amorfo, que se converte lentamente em hidroxiapatita.

Tempos de envelhecimento prolongado em temperaturas próximas a 100°C , geralmente favorecem razões Ca/P próximas a da hidroxiapatita estequiométrica (1,67) e alta cristalinidade. Assim, quando o objetivo é obter material estequiométrico é preferível adicionar lentamente a fonte de fosfato sobre uma solução de cálcio, mantendo o pH entre 8 e 9 a uma temperatura de 85°C . Se a velocidade dos reagentes for suficientemente lenta, pode-se evitar a formação de ACP e formar diretamente a HA com boa cristalinidade.

O método de síntese hidrotérmica consiste em promover a formação da hidroxiapatita a partir de soluções aquosas a temperaturas elevadas, em torno de 140 a 500°C . Para alcançar tais temperaturas sem permitir a evaporação do solvente, também se utiliza a pressão elevada. Geralmente, esse processo ocorre

em autoclaves. Dessa forma, a pressão resultante é simplesmente a pressão de vapor do solvente na temperatura desejada. Como materiais de partida tem-se usado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, H_3PO_4 e os fosfatos de cálcio $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaHPO_4 , $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, assim como a própria hidroxiapatita. O pH inicial se ajusta com NH_3 gasoso, NH_4OH e NaOH .

A via térmica de obtenção de hidroxiapatita ocorre em reações no estado sólido em temperatura elevada, de maneira que a mistura dos componentes de cálcio e fosfato ocorra de modo que a razão Ca/P corresponda ao valor teórico de 1,67.

As reações no estado sólido geralmente são controladas por processos de difusão sólido-sólido. A temperatura ambiente, a velocidade de tais processos é quase nula, assim, em temperaturas elevadas ocorre aumento da mobilidade atômica.

O processo de obtenção de HA por via térmica é composto das seguintes etapas: moagem conjunta dos sólidos reagentes, peletização e sinterização geralmente em temperaturas superiores a 900°C . Assim se produz uma HAP de alta cristalinidade, estequiometria regular e baixa solubilidade. (SECKLER et al, 1998).

Outra maneira de se obter HA é através do método sol-gel, que consiste em um método químico via úmida, que dispensa a utilização de alto vácuo e temperaturas elevadas. Por este método se obtém 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 em uma microestrutura de granulação fina que contém uma mistura de cristais de tamanho de submicron a nano sendo

muito importante para melhorar a reação de contato e a estabilidade da interface osso artificial/natural. (SANTOS et al, 2005).

2.6 PROTEÍNAS

2.6.1 Gelatina

A gelatina é em geral extraída dos ossos e tecido conjuntivo de animais. Uma outra fonte de gelatina pode provir através de algumas algas. De fato a gelatina pura é formada essencialmente por proteínas (colágeno): 84,9 % de proteína, 1-2 % de sais minerais e 8-15 % de água.

Depois de 1920 a gelatina começou a perder seu mistério, quando o físico-químico Staudinger introduziu o conceito macromolécula, que quer dizer, moléculas muito longas, formadas por pequenas unidades que se repetem. No caso das proteínas, as unidades constituintes são cerca de 20 aminoácidos diferindo suas proteínas semelhantes, no número de aminoácidos que as formam e a sua seqüência. (BARHAM, 2000). Podemos imaginar estas moléculas como fios, capazes de se dobrar sobre si mesma ou de se desenrolar segundo as características do meio em que se encontram.

As proteínas da gelatina quando dissolvidas em água e arrefecidas, podem ligar-se entre si para formar uma rede tridimensional contínua que se estende por toda a massa do líquido. A estabilidade de um composto com gelatina depende das proporções gelatina/líquido, da temperatura e de outras substâncias que se tenham adicionado.

O colágeno é formado por três cadeias em hélice, enroladas umas em torno das outras, de forma semelhante a uma corda. Quando aquecidas acima de 70° C,

estas cadeias desenrolam-se – o colágeno desnatura-se – e obtêm-se as cadeias, moléculas de proteína separadas, ao que chamam gelatina.

2.6.2 Colágeno

É a essencial proteína estrutural dos tecidos dos animais vertebrados, sendo encontrado abundantemente no tecido conjuntivo, mais especificamente no pelo, na cartilagem, ossos, tendões e no dente. (E'GUES, 2005).

Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta força elástica, constitui uma família de proteínas que se diferenciaram durante a evolução, para exercer funções diversificadas, apresenta grande resistência à tração, sendo a função estrutural a mais importante.

Devido a essas propriedades o colágeno possui uma posição privilegiada como biomaterial, sendo utilizados em diversas aplicações, tais como: reconstrução de tecidos moles, revestimento de queimaduras e outras lesões, suporte para crescimento de nervos periféricos, orientador de tecidos em desenvolvimento e como agente hemostático. Além de serem utilizados de diversas formas, como: membranas, esponjas, géis, pós, filmes, tubos, entre outros. (E'GUES, 2005).

O colágeno é amplamente utilizado como matéria prima na produção de biomateriais devido as suas propriedades naturais, que incluem: baixa resposta imunológica mesmo quando extraído de fontes heterólogas; baixo índice de alergenicidade (cerca de 2% para colágeno heterólogo); biodegradabilidade (susceptível à ação de collagenases e outras substâncias celulares); habilidade em promover crescimento celular; propriedades hemostáticas (ativação do processo de coagulação); susceptível a modificações químicas que permitem o controle da

biodegradabilidade e biocompatibilidade, propriedades reológicas, propriedades dielétricas e tensão superficial. (VULCANI, 2004).

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano, representando 30% do total das proteínas do organismo. Essa família de proteínas é produzida por diversos tipos celulares e se distingue pela composição bioquímica, características morfológicas, distribuição, funções e patologia. (VULCANI & JUNQUEIRA, 2004).

Dentre os vários tipos de colágeno existentes, o colágeno tipo I (Figura 5) é o que vem sendo mais estudado por ser o tipo mais abundante de tecido conjuntivo.

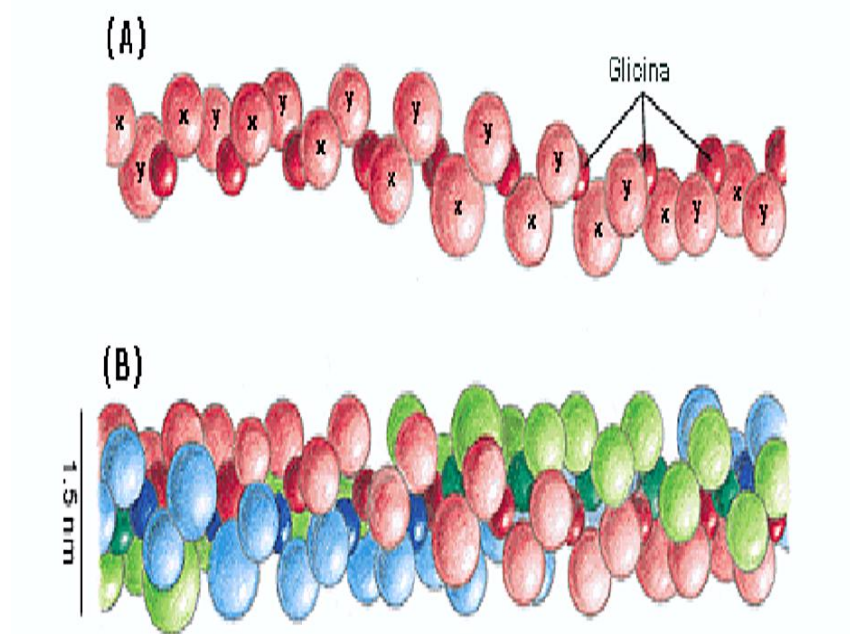


Figura 5: Representação esquemática das estruturas do colágeno. (E'GUES, 2005).

O colágeno tem como unidade básica o tropocolágeno, uma macromolécula linear semiflexível com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, sendo formada por três cadeias polipeptídicas denominadas de cadeias α , duas iguais (α_1) e uma diferenciada (α_2), contendo cada uma 1055 e 1029 resíduos aminoácidos, respectivamente.

A estrutura primária destas unidades é caracterizada pela repetição do triplete Glicina (Gly), com conteúdo de 33%, Prolina (Pro), 12% e Hidroxiprolina (Hypro), 11%. No conjunto, sua estrutura é helicoidal na forma de uma tripla hélice estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. A aproximação das três cadeias, duas α_1 e uma α_2 , só é possível porque elas em aminoácidos de cadeia lateral pequena, como a alanina, ou sem cadeia lateral, como a glicina.

A ligação de duas cadeias α entre si forma uma unidade β . Esta unidade é estável, devido a pontes covalentes que se formam entre elas, envolvendo resíduos lisil ou hidroxilisil. (VULCANI, 2004; VIEIRA, 1979).

Através das interações entre as moléculas de tropocolágeno, tem-se a formação de microfibrilas, a menor unidade estrutural do tecido conjuntivo que podem ser vistas em microscópio eletrônico de varredura como um filamento fino de 4 nm. (VULCANI, 2004).

Com essa distribuição periódica de resíduos carregados ocorre uma maior interação entre as moléculas de tropocolágeno a pH 7,4, tem-se neste pH a resultante de carga nessa molécula sendo zero. Porém, a distribuição de cargas na molécula de colágeno pode ser modificada por reações químicas específicas nos aminoácidos carregados, para produzir matrizes carregadas negativa ou positivamente. (E'GUES, 2005).

Colágeno solúvel é obtido por processos físico-químicos e pode ser utilizado na forma de filmes, esponja ou gel na liberação controlada de fármacos. Sua combinação com fosfatos de cálcio tem sido relatada em estudos de liberação de antibióticos e na melhora da estabilidade dos lisossomos. A Tabela 3 apresenta algumas das aplicações biomédicas do colágeno.

Tabela 3: Aplicações biomédicas do colágeno. (adaptada de VULCANI, 2004).

FORMA	APLICAÇÕES
Colágeno: cerâmicas fosfatadas	Reconstrução de tecido (preenchimento de cavidades ósseas), reconstrução plástica
Compósitos	Biocerâmicas do tipo fosfatos de cálcio: colágeno para reconstrução óssea
Espônjas	Agentes hemostáticos
Gel de colágeno injetável	Preenchimento
Membranas, esponjas ou géis biodegradáveis	Sistemas de liberação de fármacos
Membranas protetoras e cicatrizantes	Atelocolágeno, colágeno: elastina, colágenos com propriedades fibrinolíticas, anticoagulantes e plaquetárias, associações colágenos: células (queratinócitos, fibroblastos, condrócitos), pele artificial.
Membranas	Membranas periodontais
Próteses	Confecção de válvulas cardíacas e vasos sanguíneos
Revestimento	Próteses vasculares

Durante o processo evolutivo, certas proteínas estruturais foram modificando-se sob as influências do meio ambiente e das necessidades funcionais dos organismos animais, desenvolvendo graus variáveis de rigidez e de resistência às trações. Essas proteínas são conhecidas, coletivamente, como colágenos e os principais exemplos de seus diversos tipos são encontrados na pele, ossos, cartilagem, músculo liso e lâminas basais.

O colágeno dos tendões formam estruturas altamente assimétricas com grande resistência tensional, na pele formam fibras flexíveis, frouxamente trançadas e nas regiões duras dos dentes e ossos, as fibras colágenas estão associadas a hidroxiapatita, um polímero de fosfato de cálcio. (JUNQUEIRA, 2004; MURRAY, 2002).

Inicialmente se admitia que a síntese de colágeno fosse restrita a um pequeno número de células, como os fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos e

condroblastos. Porém atualmente sabe-se que essa atividade é muito generalizada e que muitos tipos celulares produzem colágeno. (JUNQUEIRA, 2004).

A unidade protéica que se polimeriza para formar fibrilas colágenas é uma molécula alongada denominada tropocolágeno, que mede 280 nm de comprimento por 1,5 nm de espessura. A molécula de tropocolágeno consiste em três cadeias polipeptídicas disposta em hélice, formadas por aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos. As diferenças na estrutura química dessas cadeias são responsáveis pelos vários tipos de colágeno. O motivo estrutural primário do colágeno maduro é $(\text{Gly-X-Pro/Hyp})_n$. Todo terceiro resíduo é uma glicina, o único resíduo com um grupo R pequeno o bastante para caber dentro do cordão central da super-hélice. (JUNQUEIRA, 2004; MURRAY, 2002)

Cada glicina é precedida ou por um resíduo prolil ou por um hidroxiprolil. A repulsão mutua entre os resíduos prolil força o polipeptídeo a uma conformação de hélice estendida esquerdo-direita. Os resíduos prolil e hidroxiprolil, conformacionalmente inflexíveis, conferem rigidez. (JUNQUEIRA, 2004).

A célula responsável pela síntese do colágeno é o fibroblasto. Embora os aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina fossem componentes da molécula do colágeno, estes aminoácidos não são capazes de se incorporar à molécula, quando administrados. Por outro lado, C-prolina e C-lisina incorporam-se rapidamente ao colágeno quando adicionados a meio contendo fibroblastos. Isto significa que hidroxilisina e hidroxiprolina são formados na molécula por hidroxilação de lisina e prolina. Esta hidroxilação ocorre numa molécula precursora do colágeno e que se chama tropocolágeno. O sistema enzimático responsável pela hidroxilação requer O^{2-} , Fe^{2+} , α -cetoglutarato e ácido ascórbico. (VIEIRA, 1979).

Uma das vantagens de se utilizar colágeno como biomaterial é sua fácil obtenção, este pode ser proveniente de diversas fontes, tais como tendões, serosas (bovina, porcina), pericárdio entre outras que estão facilmente disponíveis no mercado. (E'GUES, 2005).

2.7 - H A – COLÁGENO

HA:Col são biomateriais em potencial porque seus componentes individuais possuem características individuais a um biomaterial. O colágeno promove a cicatrização de fraturas e regeneração óssea e é também um agente homostático. (LAWSON, 1998).

Nos últimos anos, vários autores recomendam a utilização de HA particulada com uma série de materiais, como elastina, quitosana, colágeno, entre outros, facilitando o manuseio e a adaptação adequada do material na medida em que minimiza o desalojamento das partículas. Diversos autores sugerem o colágeno para este fim, pois este material constitui-se um agente de união biocompatível e reabsorvível responsável pela prevenção da migração das partículas cerâmicas, até a incorporação pelos tecidos do paciente.

Diversos trabalhos demonstraram que o colágeno não é só capaz de promover a proliferação de células do tecido conjuntivo, tais como os fibroblastos na confecção de novos tecidos, mas também em testes *In Vitro*, verificou-se que quando se combinava hidroxiapatita com uma esponja de colágeno, na presença de cultura de osteoblastos, estes migravam em direção a esponja e induziam a formação de uma matriz de calcificação, com a presença de cristais de HA no interior da matriz. (E'GUES, 2005).

O colágeno promove cicatrização de fraturas e regeneração óssea e é também um agente hemostático. O aspecto mais importante na utilização de colágeno na forma de compósitos com biocerâmicas é o fato de esta proteína ser a matriz em que os sais de fosfato de cálcio se depositam para dar origem ao tecido ósseo. A HA tem sido amplamente utilizada na preparação de compósitos devido à sua similaridade com o tecido calcificado do osso humano. Apresenta fragilidade característica das cerâmicas, portanto, sua combinação com colágeno torna seu uso como biomaterial mais vantajoso. (OGAWA, 2002).

2.8 LIOFILIZAÇÃO

É um processo de desidratação usado para preservar um material perecível ou torná-lo mais conveniente para o transporte. A liofilização trabalha congelando o material e então reduzindo a pressão circunvizinha, permitindo que a água congelada no material sublime diretamente da fase sólida ao gás.

Utilizando o vácuo elevado na liofilização faz com que o gelo sublime rapidamente. Uma câmara fria do condensador e/ou as placas do condensador fornecem uma superfície para o vapor se solidificar. Estas superfícies devem estar mais frias do que a temperatura da superfície do material que está sendo secado, ou o vapor não migrará ao coletor. As temperaturas para esta captação do gelo estão tipicamente abaixo de menos 50 ° C.

A liofilização tende a danificar menos o tecido que está sendo desidratado do que outros métodos da desidratação, que envolvem temperaturas mais altas. Portanto, geralmente, não causa o encolhimento ou endurecimento do material que

está sendo desidratado, e os sabores e cheiros permanecem, também, virtualmente inalterados.

A secagem por liofilização dos hidróxidos precipitados pode permitir uma diminuição na temperatura de sinterização, pela obtenção de pós altamente homogêneos, tanto quimicamente, quanto fisicamente. (ANDRADE, 2006).

A liofilização de soluções congeladas consiste, basicamente, na retirada de água, na forma de gelo, por sublimação das soluções de sais que contenham os cátions metálicos desejados. No processo, ocorre o congelamento destas soluções em forma de gotículas que aumentam a sua superfície específica e diminuem o volume. Por uma combinação de pressão e temperatura, as gotículas congeladas são secas de forma a sublimar a fase líquida congelada sem alterar a integridade física e química das gotículas iniciais do sal. (NONO, 1990).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

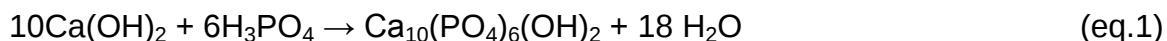
A Figura 6 descreve as etapas do trabalho experimental executado, através de um organograma e auxilia no acompanhamento da sequência das atividades executadas.



Figura 6: Organograma dos materiais e da metodologia utilizada.

3.1 SÍNTESE DA HA

Na síntese para obtenção de hidroxiapatita (HA), o método escolhido foi o aquoso ou reação por via úmida. A reação envolvida no processo de síntese da HA está representada pela equação um. (LEGEROS, 1994).



As proporções dos reagentes nas reações executadas foram ajustadas para o valor da razão Ca/P igual a 1,67.

O processo de precipitação consistiu na mistura de uma solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (2 mol.L^{-1}) com uma solução de H_3PO_4 ($1,2 \text{ mol.L}^{-1}$). A solução de hidróxido de cálcio foi colocada em um copo de béquer. Sob agitação constante e aquecimento (60°C), a solução de ácido fosfórico foi gotejada lentamente. O hidróxido de amônio foi utilizado para o ajuste do pH no valor de 9,0.

3.1.1 Síntese de HA:Gel

Para a obtenção de HA:Gel foi utilizado o método proposto por Angelo (2008). Assim, a gelatina - sem sabor e sem cor (Dr. Oetker®) foi utilizada na concentração de 10 g/L, sendo dissolvida em água MilliQ a uma temperatura de 50°C . A síntese de HA:Gel, foi realizada de acordo com o procedimento descrito anteriormente (item 3.1).

3.1.2 Secagem e calcinação

Após a síntese, as amostras de HA e HA:Gel foram envelhecidas por um dia. O precipitado foi filtrado a vácuo e dividido em duas partes. Uma destas foi seca em estufa à 100°C (Figura 7). A outra congelada por 24 horas e posteriormente liofilizada por 48 horas.

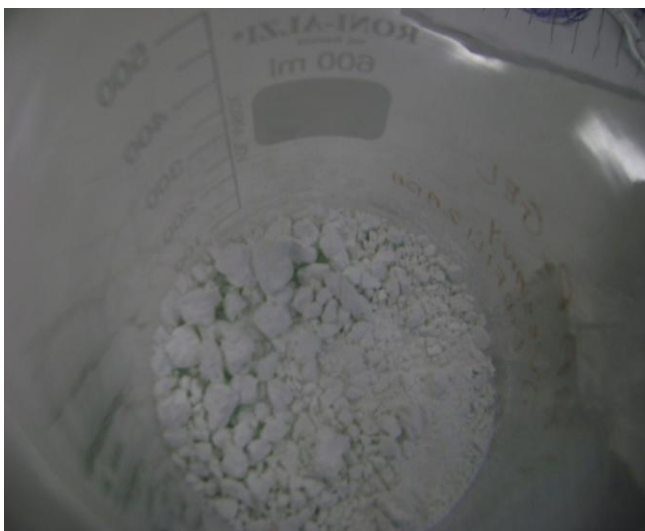


Figura 7: Pó seco.

O pó obtido foi desaglomerado em almofariz de ágata (Figura 8) e passado com peneira de malha (75x30mm).



Figura 8: Desaglomeração do pó em almofariz de ágata.

As amostras foram acondicionadas em cadinhos de porcelana e calcinadas a 700°C por 2 horas a uma taxa de aquecimento de 5°C/min em forno mufla da marca EDGCON 3P, modelo 1800, com controle automático de tempo e temperatura.

Após a calcinação das amostras, foi realizada a incorporação de sulfato de gentamicina.

3.1.3 Impregnação de sulfato de gentamicina nas amostras de HA e HA:Gel

Foi escolhido o antibiótico, sulfato de gentamicina ($C_{21}H_{43}N_5O_7 \cdot 2,5H_2SO_4$) da marca INLAB – PUREX (lote nº 829.148), para comparar alguns dados com o trabalho desenvolvido por Ferreira (2008).

Foram preparadas soluções de sulfato de gentamicina em concentrações de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0% em massa. O solvente utilizado foi o álcool etílico absoluto P.A. Posteriormente, essas soluções foram adicionadas às amostras de HA em meio aquoso. Em meio gelatinoso foi submetido apenas às concentrações 1% e 0,25% em massa.

As amostras foram colocadas em um béquer e submetidas à vibração constante no ultrassom à temperatura ambiente, por um período de três horas. O equipamento da marca AGGIL Soniclean foi operado na frequência de 40-45 KHZ. Passado às três horas, todas as amostras foram submetidas à secagem em estufa à 70°C por 24 horas. A seguir, as mesmas foram resfriadas a temperatura ambiente, acondicionadas em recipiente asséptico e armazenadas em um dessecador com sílica-gel.

3.1.4 Análises Microbiológicas

As amostras após a calcinação com e sem adição de gentamicina foram submetidas a análises microbiológicas. A metodologia utilizada para realizar os ensaios microbiológicos foi desenvolvida por Ferreira (2008).

Na realização dos ensaios microbiológicos, foram utilizadas amostras biológicas (saliva). Foi adicionado 2 mL do meio de cultura caldo BHI (“brain heart infusion”) em tubo de ensaio com 25 mg de HA e HA:Gel, ambas as amostras sem gentamicina incorporada, para verificar se a HA e HA:Col continha propriedades inibidoras ao crescimento de microorganismos.

Prepararam-se amostras controle positivo de caldo BHI e saliva para verificar a formação de bactérias e amostras controle negativo sem saliva para verificar sua esterilidade.

Os testes foram efetuados no Laboratório de Análise Microbiológica - UEPG. Sendo que, as contagens foram realizadas após os períodos de incubação de 24 a 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 (Média Cybernetics).

As etapas utilizadas no desenvolvimento dos ensaios microbiológicos estão representadas no fluxograma (Figura 9) abaixo:

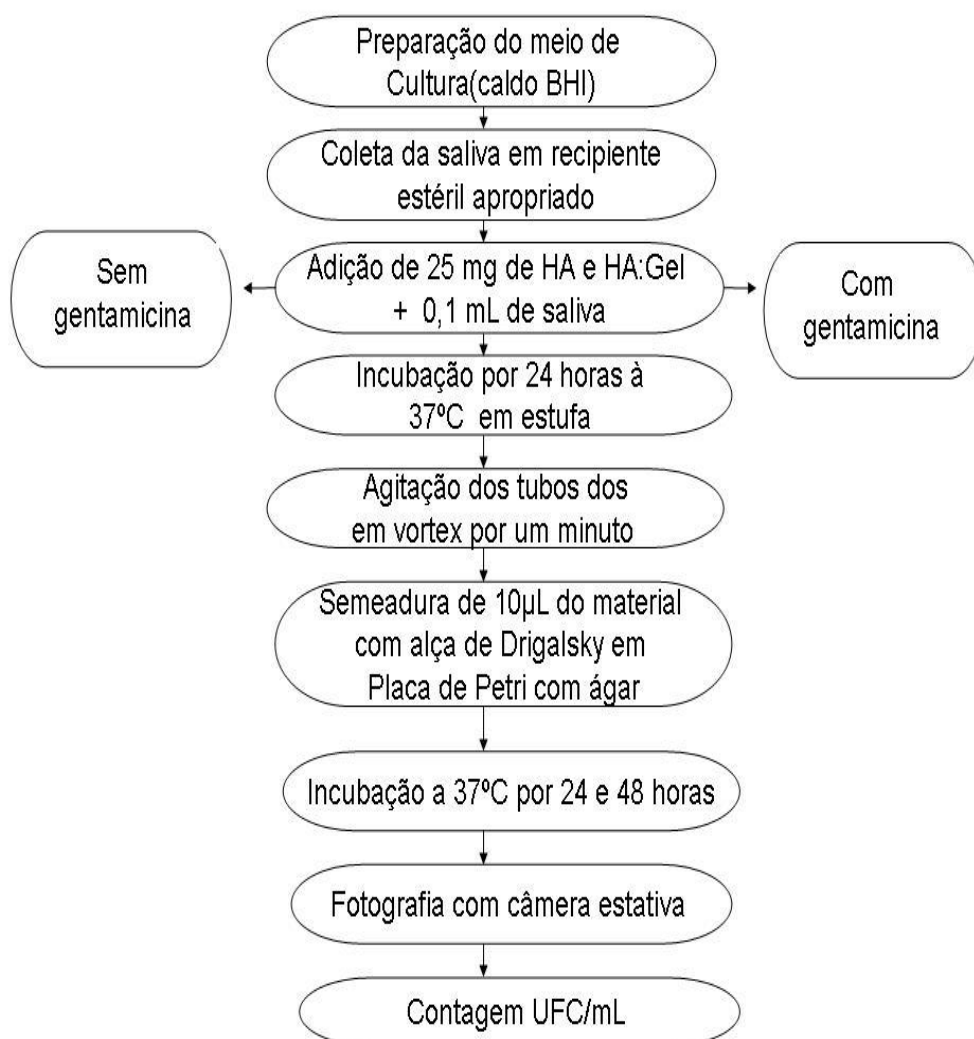


Figura 9: Etapas dos ensaios microbiológicos.

As contagens de UFC/mL, foram feitas 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 (Média Cybernetics), conforme Figura 10.



Figura 10: Contagem UFC/mL(software Image Pro-Plus 4.5).

Os códigos utilizados no texto deste trabalho estão apresentados nas tabelas 4 a 7.

Tabela 4: Código dos pós obtidos antes da calcinação.

Código	Secagem em estufa % de gelatina (g/L)	Secagem em liofilizador % de gelatina (g/L)
HA.P.E.V.	0	-----
HA.Gel.P.E.V.	10	-----
HA.P.L.V.	-----	0
HA .Gel.P.L.V.	-----	10

Tabela 5: Código dos pós após a calcinação a 700 °C.

Código	Secagem em estufa % de gelatina (g/L)	Secagem em liofilizador % de gelatina (g/L)
HA.P.E.700	0	-----
HA .Gel.P.E.700	10	-----
HÁ .P.L.700	-----	0
HA .Gel.P.L.700	-----	10

Tabela 6: Código das amostras secas em estufa e calcinadas após impregnação com massa de sulfato de gentamicina.

% de gelatina	0,25 % em massa de gentamicina	0,50 % em massa de gentamicina	1,0 % em massa de gentamicina	2,0 % em massa de gentamicina
0	-----	HA.P.E. 0,5%Gent	-----	HA.P.E. 2,0%Gent
10	HA.P.E. 0,25% Gent.	-----	HA.P.E. 1,0%Gent	-----

Tabela 7: Código das amostras liofilizadas e calcinadas após impregnação com massa de sulfato de gentamicina.

% de gelatina	0,25 % em massa de gentamicina	0,50 % em massa de gentamicina	1,0 % em massa de gentamicina	2,0 % em massa de gentamicina
0	HA.P.L. 0,25%Gent.	HA.P.L. 0,5%Gent	HA.P.L. 1%Gent.	HA.P.L. 2,0%Gent.
10	HA. Gel.L.0,25% Gent.	-----	HA.GEL. L.1,0%Gent.	-----

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS

As caracterizações dos pós foram realizadas por: microscopia eletrônica de transmissão (MET), distribuição de tamanhos de partículas; análise térmica diferencial e termogravimétrica, difratometria de Raios X; espectroscopia de absorção na região do infravermelho; área superficial específica pelo método BET; trica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

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 cerca de 10^{-5} mmHg. Um microscópio de transmissão moderno possui cinco ou seis lentes magnéticas, além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho do feixe eletrônico.

A imagem vista na MET é formada por um feixe de elétrons que passa pela amostra. Uma vez que materiais sólidos são altamente absorventes para feixes de elétrons, para que uma amostra poder ser examinada ela deve ser preparada na forma de uma película muito fina (CALLISTER, 2002).

O poder de resolução atinge valores na faixa de 0,2 nm e permite a observação não apenas de pequenos detalhes morfológicos da microestrutura, mas também da estrutura cristalina dos materiais.

São três os principais mecanismos de contraste que geram aspectos bem diferentes nas imagens observadas: contraste por espessura de massa, quanto

maior o número atômico, menor será o número de elétrons transmitidos e mais escuros aparecerá à região na imagem; contraste por difração, os elétrons difratados podem ser removidos e permitem a observação de defeitos cristalinos e partículas de segunda fase; e contraste de fase recombinção dos feixes transmitidos e difratados no plano da imagem para resolução direta da rede cristalina (KESTENBACH, BOTTA, 2002).

As análises 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 150 mil vezes.

3.2.2 Distribuição de Tamanhos de Partículas

A distribuição do tamanho médio de partículas dos pós foi determinada com o auxílio de um granulômetro. A técnica consiste na medição dos ângulos de difração do raio laser, sendo que este ângulo é relacionado ao diâmetro da partícula com boa exatidão. Um feixe de laser é enviado em direção à amostra líquida, a ser analisada. Quando o feixe colimado encontra as partículas, parte do laser é difratado e focado por meio de lentes no detector. Quanto menor o tamanho da partícula maior será o ângulo de difração.

Nesta técnica foi utilizada uma suspensão de pó em um líquido, na qual incide um feixe de raios X durante a etapa de sedimentação das partículas. Diversas propriedades dos materiais cerâmicos estão associadas ao empacotamento das partículas que os constituem.

O estudo do empacotamento de partículas pode ser definido como: “O problema da correta seleção da proporção e do tamanho adequado dos materiais particulados, de forma que os vazios maiores sejam preenchidos com partículas menores, cujos vazios serão preenchidos com partículas menores ainda e assim sucessivamente”. (OLIVEIRA et al, 2000).

Os pós de hidroxiapatita foram caracterizados a partir da análise granulométrica em um granulômetro a laser CILAS 920N.314 do CIPP-UEPG, onde foram obtidos gráficos de tamanho de partículas.

3.2.3 Análise Térmica

Os principais métodos de análise térmica são termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). A técnica de análise termogravimétrica consiste em determinar a perda ou ganho de massa que sofre uma amostra em função da temperatura e do tempo. Nesta análise termogravimétrica, a massa de uma amostra em uma atmosfera controlada é registrada continuamente como uma função da temperatura ou do tempo à medida que a temperatura da amostra aumenta (em geral, linearmente com o tempo). (SKOOG et al, 2002).

A análise térmica inclui a termogravimetria (TG) em que se mede a mudança de massa de uma substância em função da temperatura ou do tempo, a análise térmica diferencial (DTA) se mede a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência em função da temperatura quando estes são submetidas a um processo térmico controlado; na calorimetria de varredura diferencial (DSC) em que se mede a diferença de energia cedida a uma

substância e a um material de referência em função da temperatura quando são submetidas a um processo térmico controlado. (PIMENTEL & ARBILLA, 1998).

A calorimetria diferencial de varredura (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. (GIMENES, 2001).

Para avaliação da estabilidade térmica e das transformações de fases dos pós sintetizados foi realizada uma análise térmica termogravimétrica (DTA/TG) em atmosfera de ar sintético e uma velocidade de 5 °C/min.

3.2.4 Difratometria de Raios X

Os primeiros raios X foram descobertos em cinco de novembro 1895 pelo físico alemão Wilhem Conrad Roentgen, podendo hoje ser aplicado em diversas áreas do conhecimento, entre elas, nas aplicações tecnológicas para descobertas de novos materiais baseados em substâncias cristalinas e na pesquisa em busca de novas drogas.

Em 1912, Von Laue confirmou que se os cristais são compostos de átomos regularmente espaçados que atuam como centros espalhadores de Raios X, e se os raios X são ondas eletromagnéticas com comprimento de onda aproximadamente igual às distâncias interatômicas nos cristais, então deve ser possível difratar raios X utilizando-se cristais. Em 1915 seus experimentos foram vistos por pesquisadores ingleses, onde Willian Lawrence Bragg expressou as condições matemáticas de maneira simples para que a difração ocorra.

Deduzindo a chamada equação de Bragg onde os raios X devem ser refletidos somente se o ângulo de incidência satisfaça a condição de que: $\sin\theta = n\lambda / 2d$. (CULLITY, 1978).

Desde sua descoberta, a difração de raios X tem sido importante fonte de informação para a ciência e a indústria, pois fornece um meio conveniente e prático para a identificação qualitativa de compostos cristalinos. O método de difração de raios X usando amostra policristalina, ou método de pó, é único, porque somente este método analítico é capaz de fornecer informações qualitativa e quantitativa sobre os compostos presentes em uma amostra sólida. (SKOOG et al, 2002).

Denominamos raios X uma radiação eletromagnética de comprimento de onda curto produzida pela aceleração ou desaceleração de elétrons de alta energia ou pelas transições de elétrons dos orbitais internos dos átomos. O intervalo de comprimentos de onda dos raios X vai cerca de 10^{-5} Å até 100 Å. (CULLITY, 1978; SKOOG et al, 2002).

Os raios X são produzidos quando elétrons são acelerados a partir do cátodo (um filamento de tungstênio) e atingem o ânodo metálico, mantido em um alto potencial. A maior parte da energia dos elétrons é dissipada na forma de calor. Como resultado se obtém um difratograma com picos que podem ser associados às distâncias interplanares das fases presentes. O difratograma obtido pode ser então comparado com os padrões difratométricos de fases individuais disponíveis no ICDD (International Center For Diffraction Data, antigo JCPDS - Joint Committee of Powder Diffraction Standards) para os vários fosfatos de cálcio. Tratamentos matemáticos possibilitam a identificação precisa dessas

fases, do grau de cristalinidade do material e do tamanho médio dos cristais. (SENA, 2004).

Os métodos de caracterização fazendo uso da difração de raios X ou de nêutrons envolvem: indexação de fases cristalinas, refinamentos da cela unitária, determinação de tamanho de cristalito e microdeformação de rede, análise quantitativa de fases, determinação de estruturas cristalinas, refinamento de estruturas cristalinas, determinação de orientação preferencial (textura), entre outros. Existem vários métodos para cada um dos objetivos acima, porém, o método de Rietveld permite, simultaneamente, realizar refinamento de cela unitária, refinamento de estrutura cristalina, análise de microestrutura, análise quantitativa de fases, e determinação de orientação preferencial. Na identificação das fases presentes nas amostras utilizou-se a técnica de difratometria de raios X. As análises foram realizadas em amostras na forma de pó, sendo as leituras efetuadas no intervalo de 2θ de 15 a 90°, em um equipamento marca SIEMENS modelo D5000D.

3.2.5 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

A radiação de infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. O fato de cada grupo funcional absorver uma dada frequência característica permite que por meio de um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectro de IV, seja possível caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido. (CIENFUERGOS & VAITSMAN, 2000).

Esta técnica pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra, pois, a frequência com que a molécula vibra depende das massas de seus átomos e da força de suas ligações. (INTRODUÇÃO, 2008).

A absorção de radiação infravermelha causa transições de níveis vibratórios de energia das moléculas. A utilização dessa técnica reside no fato de que somente comprimentos de onda muito específicos de luz infravermelha podem ser absorvidos quando um determinado tipo de molécula está no caminho da radiação. A absorbância versus o comprimento de onda fornece uma “impressão digital” da molécula. (SILVA, 2006).

Através da espectroscopia no infravermelho podem-se identificar algumas substituições ou alterações importantes na composição da HA, particularmente nos grupos fosfatos e hidroxila. Essas informações são obtidas pela execução dos modos de energia vibracionais desses grupos moleculares dentro da estrutura dos sólidos. Pode-se diferenciar a substituição dos grupos OH^- e $(\text{PO}_4)^{3-}$ pelos grupos $(\text{CO}_3)^{2-}$ por meio da presença de bandas em 873, 1465, 1534 cm^{-1} e 874, 1420, 1455 cm^{-1} , respectivamente. (ELLIOT, 1994).

O equipamento que mede as alterações nas vibrações e rotações das moléculas denomina-se espectrômetro de infravermelho sendo composto basicamente de uma fonte de radiação, espelhos, cela de amostra e detector. Algumas sofisticacões instrumentais dividem os espectrômetros no infravermelho, tais como: aparelhos com monofeixe, duplo feixe, transformada de Fourier ou laser.

As análises de Espectroscopia de Infravermelho foram realizadas no Laboratório de Análises em Espectroscopia/UNESP, sendo que o aparelho utilizado foi um Espectrofotômetro FTIR DIGILAB modelo EXcalibur FTS 3000 HE.

3.2.6 Análise de área superficial BET

Existem várias teorias para a medida da área superficial e porosidade utilizando a sorção de gás, por exemplo, modelo BET e LANGMUIR, sendo que BET significa Brunauer, Emmett e Teller, os nomes dos pesquisadores que em 1938 propuseram este método. A análise de BET pode ser feita por um único ponto ou por vários pontos.

Nesta análise os seguintes termos e seus significados são muito importantes:

- Adsorbato: Material que foi retido pelo processo de adsorção.
- Adsorvente: Qualquer sólido que tem a habilidade de concentrar quantidades significativas de outras substâncias na superfície.
- Adsorção: um processo no qual moléculas do fluido são concentradas na superfície de outro material, por forças químicas ou físicas, ou ambas.
- Área Superficial: área total da superfície de um pó ou sólido, incluindo área externa e superfícies internas acessíveis (poros, fraturas, fissuras, etc).
- Área Superficial Específica: área superficial por unidade de massa.

Área superficial ajuda a determinar entre outras coisas, como os sólidos se dissolvem, queimam e reagem com outros materiais.

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 normalmente nitrogênio 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 de gás adsorvido a cada pressão, à 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.

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.

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 de gás é aplicada para determinar a quantidade de gás adsorvido.

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 (histerese) de adsorção e desorção.

As análises das formas das isotermas revelam informações sobre as características da superfície e dos poros do material.

A área superficial específica dos pós de HA foi determinada a baixa temperatura utilizando um equipamento Micrometrics Gemini V.

3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Microscopia Eletrônica de Varredura, um feixe colimado de elétrons varre a superfície da amostra. Sendo geralmente usado para observações de amostras espessas, ou seja, basicamente não transparentes a elétrons. A razão principal de sua aplicação está associada à alta resolução que pode ser atingida, da ordem de 3,0 nm, e à grande profundidade de foco, da ordem de 300 vezes melhor que a do microscópio óptico, resultando em imagens com aparência tri-dimensional. (KESTENBACH & BOTTA, 2002).

O MEV foi utilizado para a observação da morfologia e dos estados de compactação dos pós de HA e HA:Gel, através de imagens de superfícies, esta técnica permite a visualização topográfica das amostras. A obtenção destas imagens é conseguida pelo princípio da reflexão do feixe de elétrons, que é projetado sobre a superfície da amostra.

A incidência do feixe de elétrons no mineral promove a emissão de elétrons secundários, retroespalhados e absorvidos, assim como de raios X característicos e de catodoluminescência. (INTRODUCTION, 2009). A imagem eletrônica de varredura representa o mapeamento e a contagem de elétrons secundários (SE – *secondary*

electrons) e retroespalhados (BSE – *backscattering electrons*) emitidos pelo material analisado. (REED, 1996).

A análise ocorre com contraste por elétrons retroespalhados de maior energia, oriundos de uma profundidade maior da amostra. Esse contraste é fortemente dependente as espécies atômicas envolvidas. Isso faz com que essa técnica seja potencialmente usada na identificação de fases que não apresentam significantes diferenças morfológicas. (SILVA, 2006).

No que se refere à preparação das amostras deve-se considerar que materiais não condutores necessitam de uma camada condutora sobre a superfície para aterrar os elétrons que as atingem e, portanto evitar efeitos de carregamento, que impedem a obtenção de imagens satisfatórias formadas por elétrons secundários. (KESTENBACH & BOTTA, 2002).

O esquema representado na Figura 11 consiste em um canhão de elétrons usado para a produção do feixe de elétrons com energia e quantidade suficiente para ser captado pelos detectores, um sistema de demagnificação, onde esse feixe eletrônico é então demagnificado por várias lentes eletromagnéticas, cuja finalidade é produzir um feixe de elétrons focado com um pequeno diâmetro numa determinada região. Da unidade de varredura, da câmara de amostra, do sistema de detectores e do sistema de visualização.

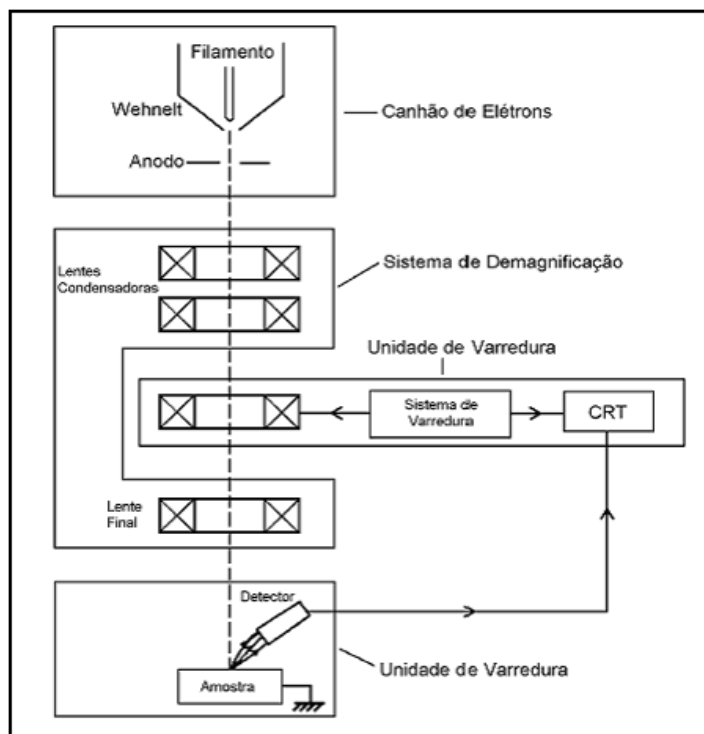


Figura 11: Esquema dos componentes do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)
Adaptado da referência (REED, 1996).

A microestrutura dos pós das apatitas sintetizadas foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura em um equipamento marca SHIMADZU SS 550 (CIPP/UEPG). As amostras foram metalizadas com Au.

3.2.8 Sistema de Energia Dispersiva (EDS)

Ao MEV pode ser acoplado o sistema de EDS (*Energy Dispersive System*), o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos. 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.

Os microscópios eletrônicos de varredura equipados com detectores de energia dispersiva de raios X são de fundamental importância na determinação da composição química 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. (SKOOG et al, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O comportamento da HA depende de forma marcante da metodologia utilizada, das condições de síntese e do processo de secagem. A HA pode apresentar-se com diferentes fases, porosidade, cristalinidade, formas (agulhas, esferas), entre outros. Estas variáveis repercutem nas propriedades finais do material, tais como osteocondução e inibição do crescimento bacteriano. Portanto, a presente discussão aborda, primeiramente, a caracterização dos pós de partida antes e após a calcinação.

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão(MET)

A morfologia dos pós e o tamanho de partícula foram avaliados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), conforme Figuras 12 e 13.

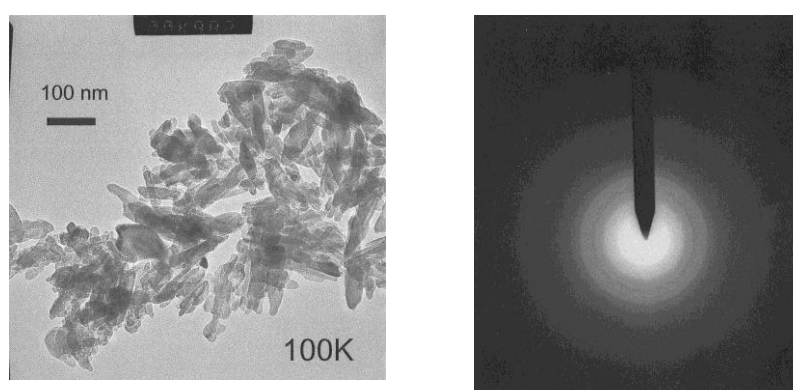


Figura 12: Fotomicrografia obtida por MET da amostra HA.

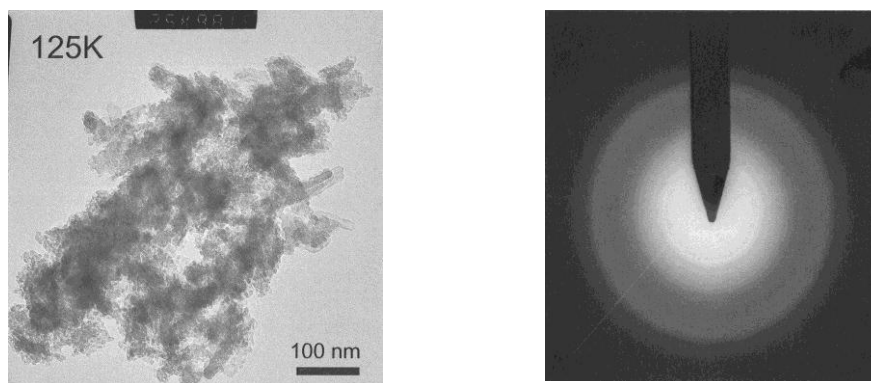


Figura 13: Fotomicrografia obtida por MET da amostra HA:GEL.

Analizando as fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), pode-se confirmar a presença de aglomerados nas amostras de HA e HA:Gel o que é uma tendência comum para pós finos obtidos durante reações químicas. Em todas as amostras se observam nanopartículas alargadas (“bastonetes”), de longitude variavel. De igual modo observa-se anéis concêntricos de difração, o que indica certa cristalinidade. Nas amostras HA:Gel observa-se agregados de nanopartículas menores do que na HA pura de 9 a 10 nm e partículas alargadas de um 20 a 40 nm de longitude.

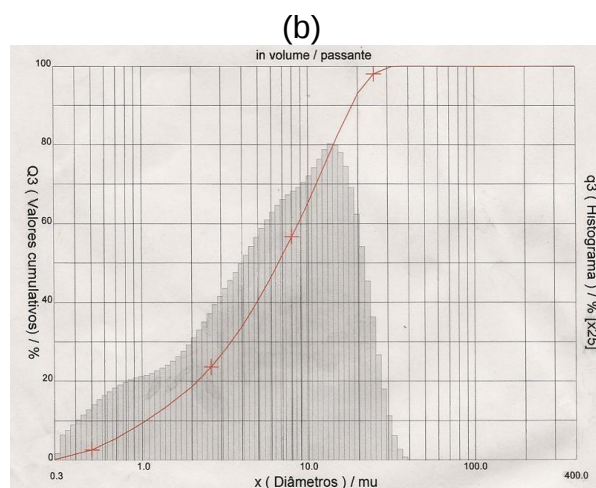
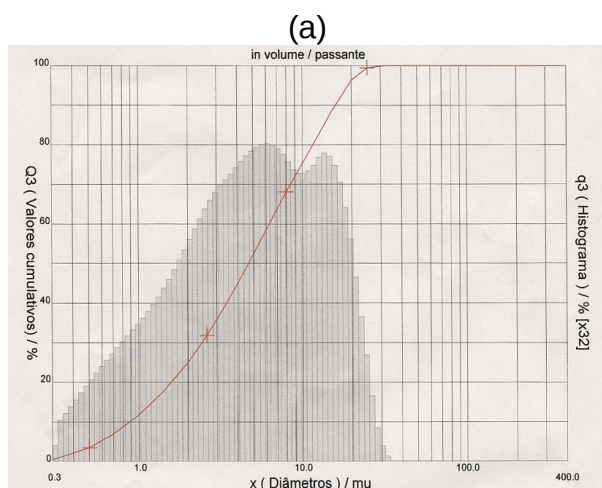
4.5 ANÁLISES GRANULOMÉTRICAS

Os pós produzidos foram caracterizados quanto ao tamanho de partículas, através de análises granulométricas, conforme tabela 8 e seus respectivos gráficos (Figura 14). Onde os diâmetros médios do volume correspondem a média das

porcentagens acumuladas entre 10%,50% e 90% para as amostras não calcinadas de hidroxiapatita secas em estufa e liofilizadas.

Tabela 8: Resultado da distribuição granulométrica dos pós não calcinados de HA.

Amostras	Diâmetro Médio (μm)	Porcentagem < (μm)		
		10%	50%	90%
HA.P.E.V.	6,74	0,88	4,69	15,93
HA.P.L.V.	8,46	1,05	6,63	18,45
HA.Gel.P.E.V.	8,77	1,02	5,99	21,05
HA.Gel.P.L.V.	9,22	1,12	7,32	19,92



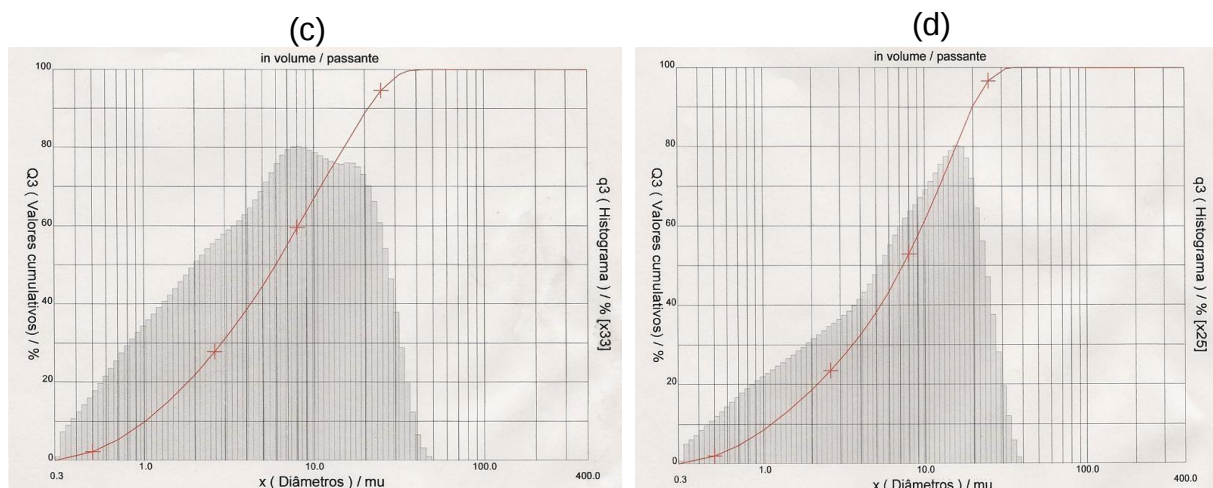


Figura 14: Gráficos de distribuição granulométrica das amostras: a) HA.P.E.V. , b) HA.P.L.V. , c) HA.Gel.P.E.V. e d) HA.Gel.P.L.V.

Nas amostras verdes liofilizadas os diâmetros médios de aglomerados são maiores do que nas amostras secas em estufa, isto sugere que apresentam maior interação na formação de aglomerados.

4.1 ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) E TERMOGRAVIMETRICA (TG)

As figuras 15 e 16 ilustram as curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) para os pós de HA.

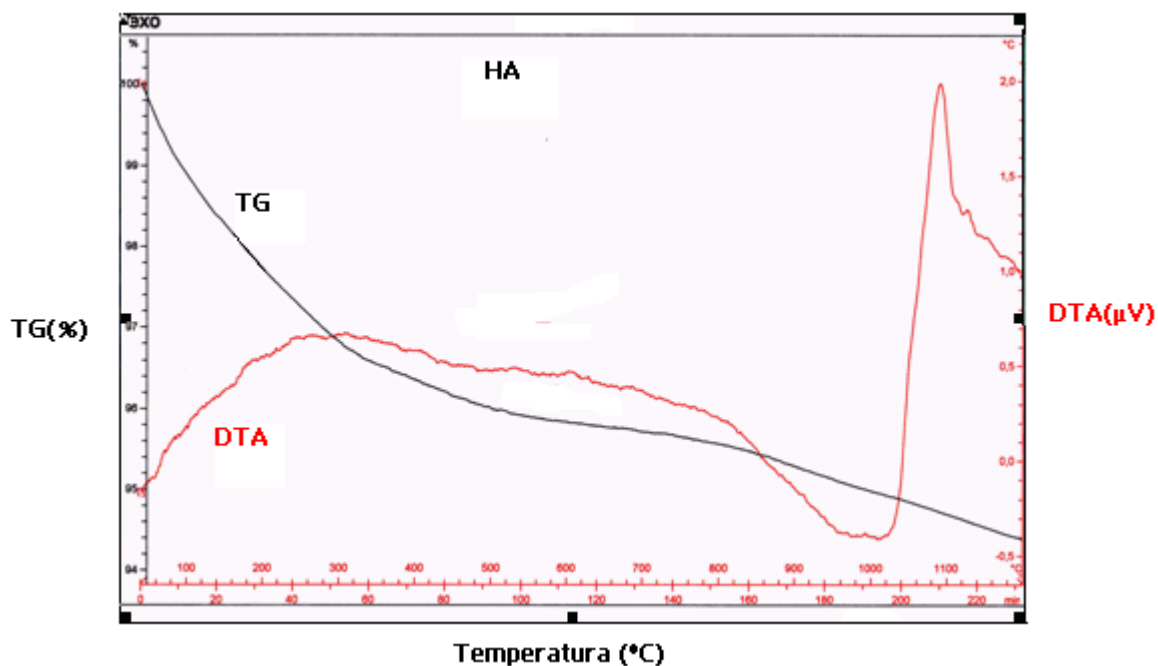


Figura 15: Curvas representativas de TG e DTA obtidas sobre o pó de HA.P.E.V.

Para a amostra de HA.P.E.V a perda de massa mais significativa, em torno de 3,5%, ocorre até a temperatura de aproximadamente 400°C, que pode estar associada à perda parcial de moléculas como H_2O e CO_2 .

A figura 16 ilustra as curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) para o pó de HA.Gel.P.E.V.

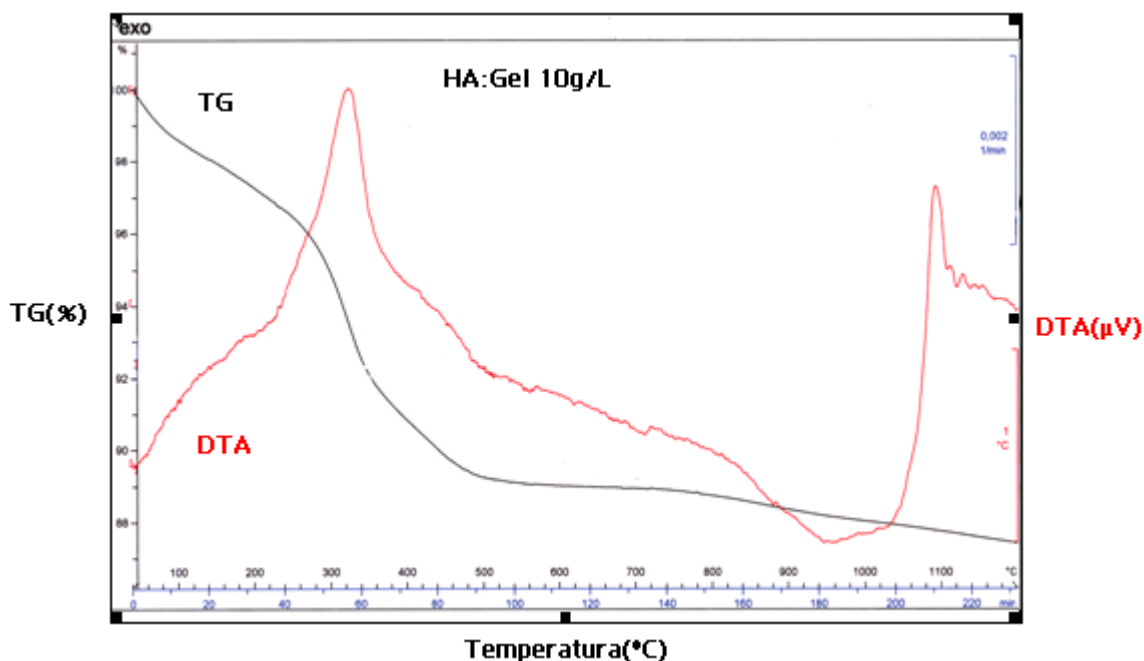


Figura 16: Curvas representativas de TG e DTA obtidas sobre o pó de HA.Gel.P.E.V.

Como pode ser observada nas Figuras 15 e 16 a perda completa destas moléculas deve ocorrer em temperaturas superiores a 700°C, pois até esta temperatura ainda são observadas nos espectros de infravermelho bandas características dos grupos H-O de água de cristalização adsorvida em aproximadamente 3400 e 1640 cm^{-1} e de C-O de CO_3^{2-} em 1456-1417 cm^{-1} (Figura 17). Após 400°C a massa permanece praticamente constante, voltando a diminuir na faixa de 800-1100°C, possivelmente relacionada às reações de decomposição da hidroxiapatita deficiente em cálcio, e a eliminação completa das moléculas de CO_2 , o que está de acordo com o verificado por Landi et al (LANDI et al, 2004).

A partir da temperatura de 1000°C a contínua perda de massa pode estar associada à desidroxilação e/ou decomposição da hidroxiapatita isoterma a 1200°C em atmosfera de ar para uma amostra de hidroxiapatita pura.

Na Figura 16 observa-se um pico exotérmico no intervalo de temperatura de aproximadamente de 250 a 450 °C esse pico está relacionado com a eliminação de matéria orgânica decorrente da presença da gelatina na amostra de HA .

Ao se comparar as amostras no que se refere ao processo de secagem, observa-se que aquelas que passaram pelo processo de liofilização apresentaram maior perda de massa ao longo do programa de aquecimento da análise termogravimétrica. Como a diferença é mais evidente nos primeiros estágios do aquecimento, próximo de 400°C, faixa de temperatura em que se espera ocorrer a eliminação de água, pode-se sugerir que o processo de secagem mais efetivo no que se refere à eliminação destas moléculas foi o processo de secagem em estufa, indicando que o tempo de liofilização poderia ter se estendido para garantir uma maior eliminação das moléculas de água.

4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Na Figura 17 estão apresentados espectros de IV relativos às amostras não calcinadas de hidroxiapatita pura seca em estufa, hidroxiapatita pura liofilizada, hidroxiapatita com adição de gelatina na concentração de 10g/L seca em estufa e hidroxiapatita com adição de gelatina na concentração de 10g/L liofilizada.

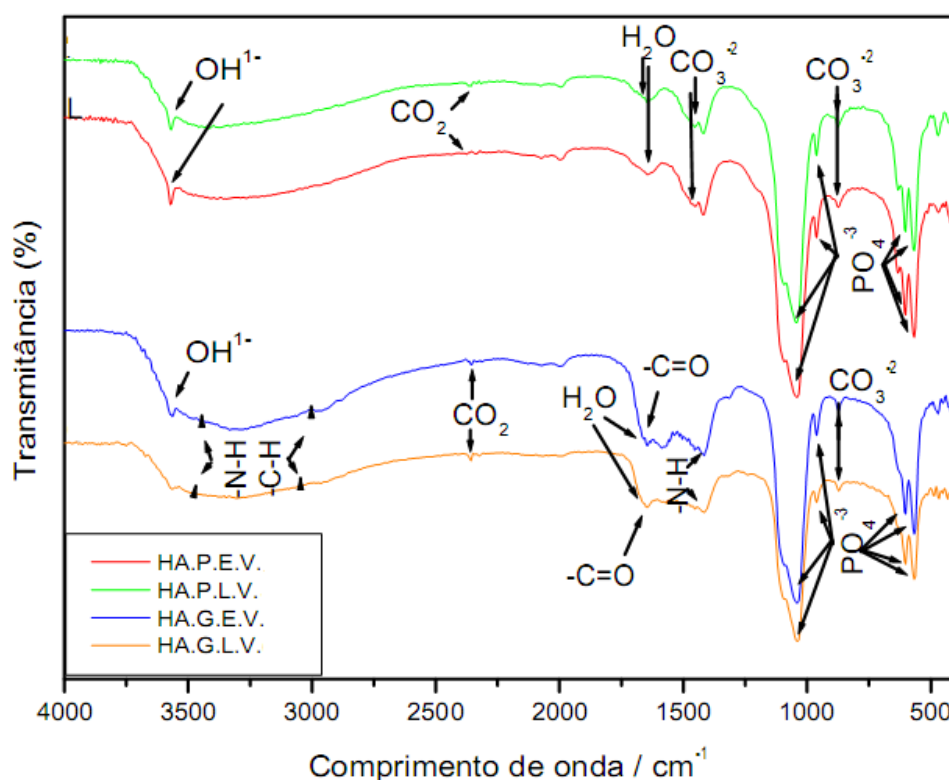


Figura 17: Resultados dos espectros de IV relativos às amostras não calcinadas de HA e HA:Gel.

Os espectros correspondentes a Figura 17 apresentam absorção semelhantes nas bandas de 562 cm^{-1} , 600 cm^{-1} , 959 cm^{-1} e 1042 cm^{-1} , indicando a presença dos grupos PO_4^{3-} , que são típicas àquelas descritas para a HA. (ELLIOT &

LEGEROS, 1994). As bandas encontradas em 3574 cm^{-1} indicam um estiramento da ligação O-H estrutural. A presença de CO_2 absorvido do meio ambiente pode ser identificada na faixa de 2360 cm^{-1} . A existência de bandas presentes na faixa de 873 cm^{-1} deve-se a presença dos grupos carbonatos $(\text{CO}_3)^{2-}$. É possível identificar nas amostras HA:Gel.P.E.V. e HA .Gel.P.L.V. bandas largas entre 3462 e 2962 cm^{-1} , correspondentes a presença de grupos amino (-N-H) provenientes de aminoácidos da gelatina. Também aparece sobreposta na região de 3500 a 3000 cm^{-1} outro tipo de deformação, característico ao grupo (-C-H) presentes na gelatina.

Nos espectros com adição de gelatina, podem-se observar os picos em aproximadamente 1450 cm^{-1} correspondente aos grupos amino (-N-H) e 1635 cm^{-1} as amidas $-\text{C}=\text{O}$, sendo que esse pico também é atribuído à deformação angular da água em todos os espectros das amostras da Figura 17.

Os resultados obtidos na caracterização por infravermelho mostram bandas características da HA. Estas são atribuídas aos grupos funcionais dos ortofosfatos (PO_4^{3-}) , hidroxilas (OH^-) e água, confirmando a obtenção da fase desejada. Em apatitas biológicas, alguns dos íons PO_4^{3-} são substituídos por íons CO_3^{2-} e o espectro de IV são bastante sensíveis para estas substituições dos carbonatos.

As amostras sem tratamento térmico (Figura 17) e com tratamento (Figura 18) apresentam bandas fracas nas regiões de 1411 - 1421 e 1453 - 1467 cm^{-1} que foram atribuídas ao íon CO_3^{2-} . Uma banda a 877 cm^{-1} foi observada. Alguns autores atribuem esta banda (877 cm^{-1}) ao íon hidrogenofosfato. (DESTAINVILLE et al, 2003) e não ao íon carbonato. Contudo, como foi encontrado na literatura, o aparecimento de bandas nas regiões de 1411 e 1467 cm^{-1} confirma que a banda em 877 cm^{-1} é característica do grupo CO_3^{2-} substituindo o sítio dos grupos PO_4^{3-} característico da hidroxiapatita carbonatada. (ELLIOT, 1994).

As Figuras 18 e 19 apresentam os resultados de espectroscopia de infravermelho efetuados nas amostras calcinadas.

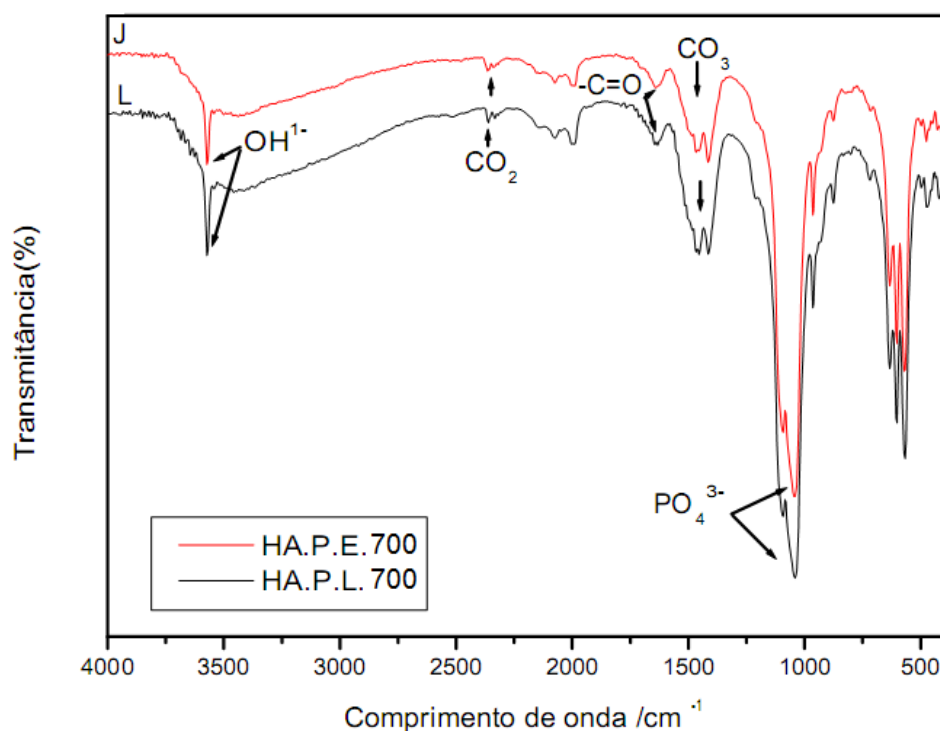


Figura 18: Resultados dos espectros de IV relativos às amostras HA seca em estufa e liofilizadas após a calcinação.

Na Figura 18 observa-se bandas de estiramento de O-H em aproximadamente 3575 cm^{-1} do grupo hidroxila da HA e de P-O (de grupos PO_4^{3-}) a 1090 e 1033 cm^{-1} , bem como O-H de água absorvida. As intensidades destas últimas diminuem com o aumento da temperatura, sugerindo que estas moléculas não são totalmente eliminadas após o aquecimento de 700°C .

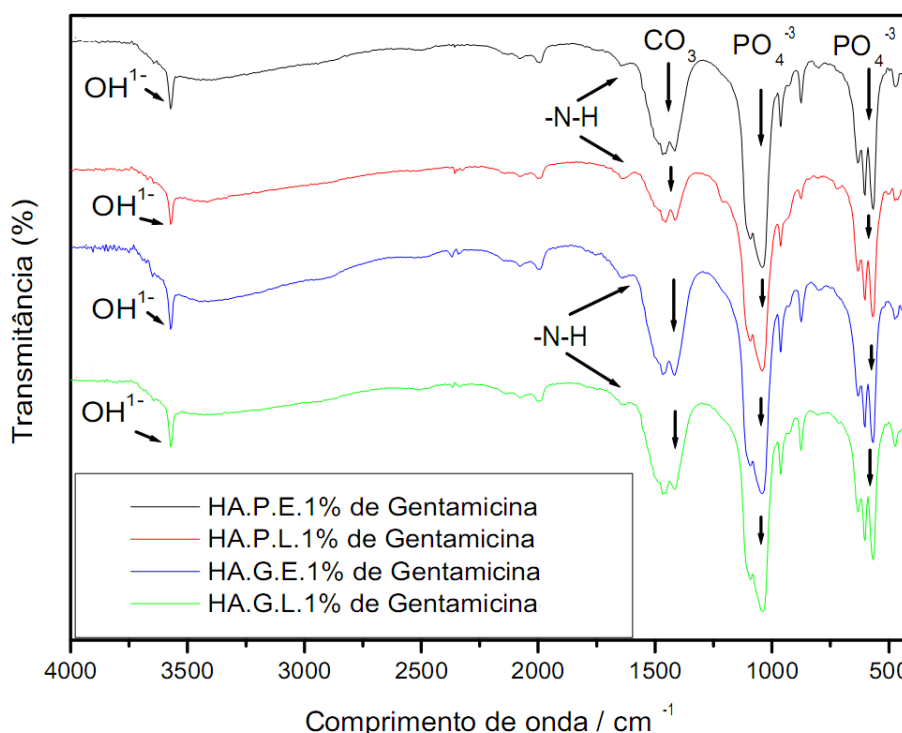


Figura 19: Resultado dos espectros de infravermelho das amostras com 1% de gentamicina incorporada.

São observadas bandas em aproximadamente 568, 600 e 1042 cm^{-1} que corresponde às vibrações características de grupos PO_4^{3-} . Ainda a presença de bandas de absorção de CO_3^{2-} , em 1451 e 962 cm^{-1} , evidenciando que a hidroxiapatita obtida é uma hidroxiapatita carbonatada. Também estão presentes bandas em 3574 cm^{-1} referentes ao grupo OH. O pico que aparece em 1635 cm^{-1} é característico de ligação -N-H presente após incorporação de gentamicina.

A Figura 20 refere-se aos respectivos resultados de IV das amostras calcinadas de hidroxiapatita pura seca em estufa e liofilizadas com 1% em massa de gentamicina; 0,5% em massa de gentamicina; 2% em massa de gentamicina.

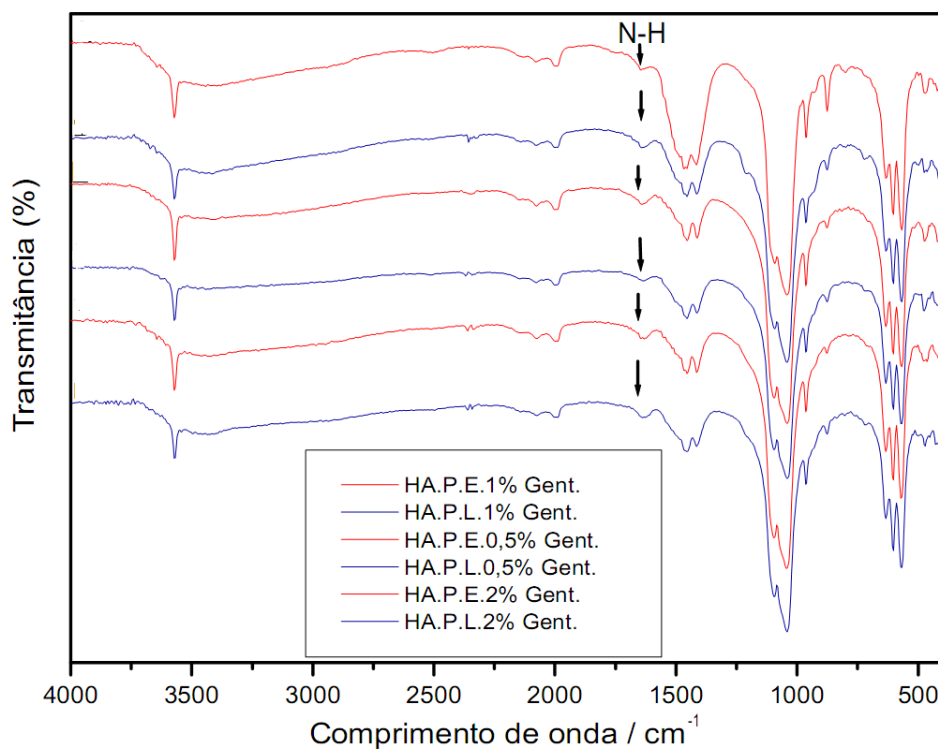


Figura 20: Resultados de IV das amostras após impregnação com gentamicina.

A impregnação de gentamicina em diferentes porcentagens em massa não interferiu na estrutura da hidroxiapatita obtida. A presença de gentamicina é confirmada pela presença das bandas características da ligação –N–H em 1635 cm⁻¹.

4.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A identificação do material obtido, provocadas pelas variações de temperatura e adição de gelatina, foi determinada por difratometria de raios X (DRX).

A Figura 21 apresenta o difratograma de raios X dos pós obtidos de hidroxiapatita pura, antes da calcinação, secos em estufa à 100°C ou liofilizados por 48 horas e calcinados à 700°C por 2 horas das amostras puras sem e com calcinação.

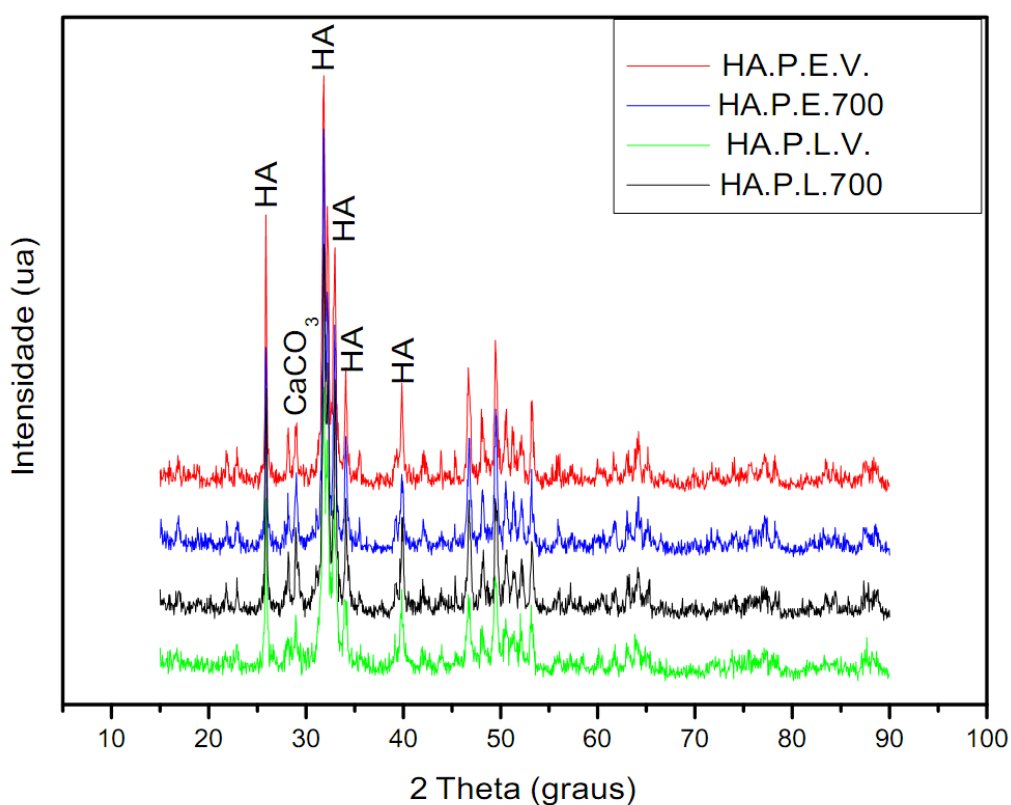


Figura 21: Difratograma de raios X efetuado das amostras HA.P.E.V., H.A.P.L.V.com e sem calcinação a 700 °C.

Em todas as amostras (Figura 21) observam-se picos localizados em aproximadamente $2\theta=26,0^\circ$, $2\theta=31,79^\circ$, $2\theta=32,92^\circ$, $2\theta=34,08^\circ$ e $2\theta=39,8^\circ$,

respectivamente. Tais picos são característicos as fases de apatitas (LI et al, 2007). Os resultados de difratometria de raios X das amostras foram comparados com um difratograma padrão de hidroxiapatita, por meio do banco de dados JCPDS, ficha número 09-0432.

A Figura 22 apresenta o difratograma de raios X representativo dos pós obtidos, após a síntese de HA com adição de 10g/L de gelatina, não calcinados, seco em estufa à 100°C ou liofilizados por 48 horas. As amostras foram calcinadas à 700°C por 2 horas. A amostra HA.Gel.E.700, após ter sido submetida ao tratamento térmico ficou em vibração constante no ultrassom durante três horas (HA.Gel.E.700 ultrassom).

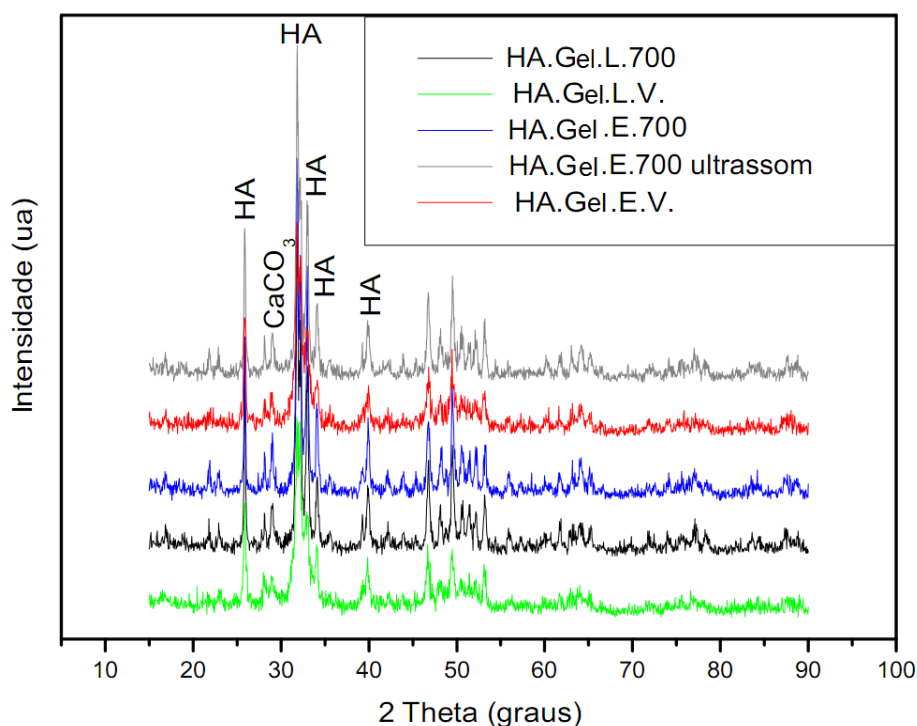


Figura 22: Difratograma de raios X efetuado nas amostras HA:Gel com e sem calcinação.

Os picos encontrados na HA:Gel são característicos da HA. Entretanto, as amostras com adição de gelatina (Figura 21), possuem picos com menor intensidade

em $2\theta=26,0^\circ$ (002) e $31,79^\circ$ (211) ao serem comparadas às amostras de hidroxiapatita pura (Figura 20). A intensidade desses dois picos principais em (002) e (211) em HA:Gel, indica a redução do cristal com aumento de energia . (CHANG et al, 2003). Na amostra HA:Gel.E.700 ultrassom (Figura 22), onde utilizou-se um equipamento de ultrassom para dispersão homogênea de partículas, houve uma melhor definição dos picos.

Pode-se observar em todas as amostras uma pequena fração dos íons carbonatos presentes nos picos próximos à $2\theta = 30^\circ$, podendo estar relacionado ao processo de precipitação que ocorre durante a síntese, porém, a quantidade de carbonato presente nas amostras não foi quantificado. De acordo com a literatura, mesmo quando se utiliza o Método de Rietveld para quantificação das fases, existe uma dificuldade de ajuste das reflexões nas regiões de 25° e entre $31-34^\circ$ podendo estar relacionada à presença de grupamentos carbonatos na estrutura de HA formada, uma vez que as reflexões para HA e para hidroxiapatita carbonatada são: $25,90^\circ$; $31,80^\circ$ e $32,93^\circ$ (ficha JCPDS 9-432) e $25,75^\circ$; $32,19^\circ$ e $33,43^\circ$ (ficha JCPDS 19-272), respectivamente (SENA, 2004).

Os estudos de raios X realizados nos materiais obtidos, evidenciaram em seus difratogramas a presença da fase hidroxiapatita, representada pela estrutura hexagonal ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) observada no ângulo $2\theta = 31,79^\circ$ o pico de maior intensidade, representado pelo plano de difração (211), em todas as amostras representadas pelas Figuras 21 e 22.

4.6 BET

Os fenômenos de interação que desencadeiam o contato do biomaterial com o meio biológico, os quais são precursores de eventos posteriores, estão determinados pela estrutura, área, morfologia (forma, tamanho de partículas, área superficial específica) e composição da superfície em escala molecular (nanômetro). Neste trabalho a área superficial específica dos pós calcinados à 700 °C por 2 horas foi determinada pelo método BET. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados de BET das amostras de HA e HA:Gel calcinadas.

Amostras calcinadas	Área Superficial específica (m²/g)	Área de microporos (m²/g)
HA.P.E.	23,5014	2,8238
HA:Gel. E.	37,3793	4,3822
HA.P.L.	29,4233	4,5137
HA:Gel.L.	33,5610	10,0141

Os resultados apresentados na Tabela 9 deixa evidente a influência da gelatina e do método de secagem na área superficial específica dos pós de HA, assim como, na área de microporos.

Sabe-se que a precipitação à partir de uma dissolução origina partículas precursoras que se aglomeram e formam uma estrutura porosa. Neste caso a adição da gelatina na dissolução proporcionou um aumento na microporosidade do material após a calcinação, provavelmente, devido a eliminação da mesma com a

temperatura, ou seja, a eliminação de matéria orgânica durante o tratamento térmico, que também podem gerar uma estrutura porosa.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microestrutura do pó obtido após a calcinação foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (Figuras 23 a 27). Observa-se que os pós são compostos por partículas formando diversos aglomerados.

A Figura 23 representa a morfologia das partículas da hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com incorporação de gelatina, secas em estufa e sinterizadas à 700° C.

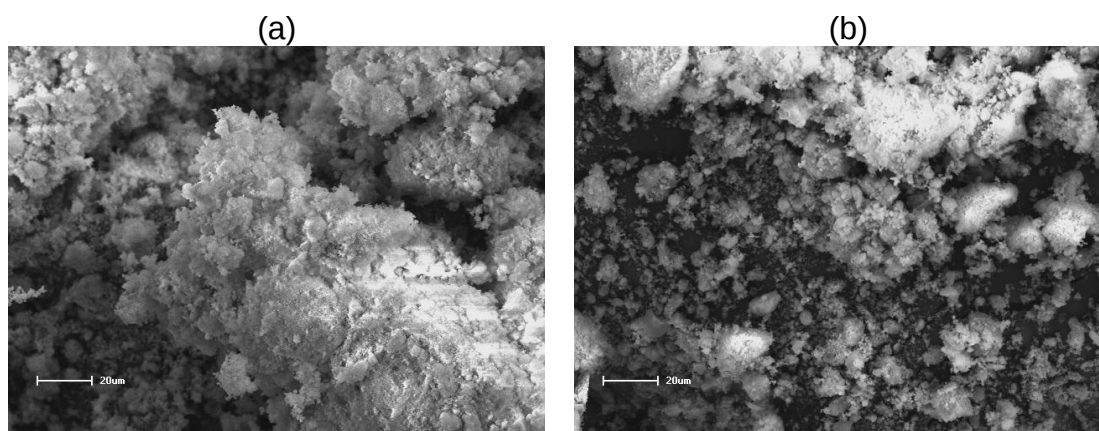


Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA.P.E.700 e HA:Gel. E.HA:Gel700.

Observa-se que nas amostras com adição de gelatina as partículas apresentam-se menos aglomeradas.

As Figuras 24, 25 e 26 mostram as micrografias que correspondem a comparação dos pós de HA e HA:Gel sem e com incorporação de diferentes porcentagens em massa de gentamicina .

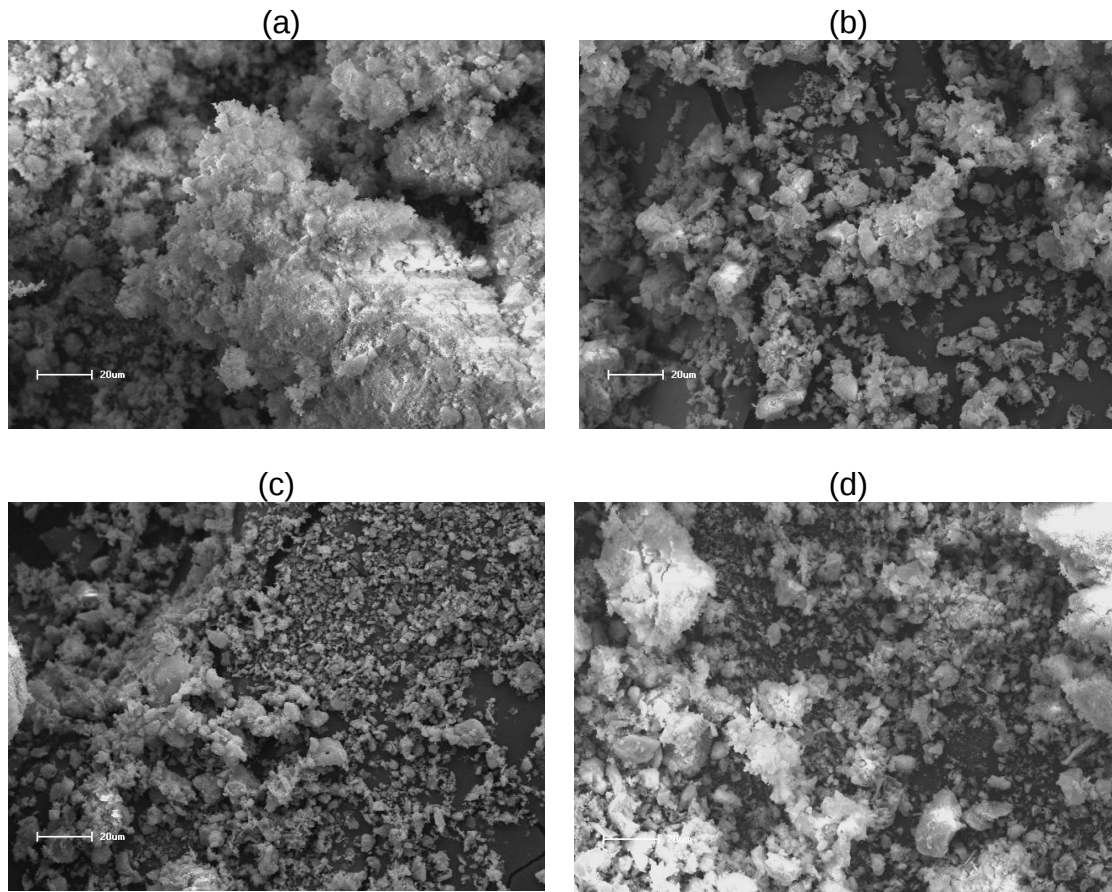


Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA secos em estufa e calcinados, sem incorporação de gentamicina HA.P.E., com incorporação de gentamicina P.E.x% Gent., sendo x: (a) 1% (b) 0,5% e (c) 2,0%.

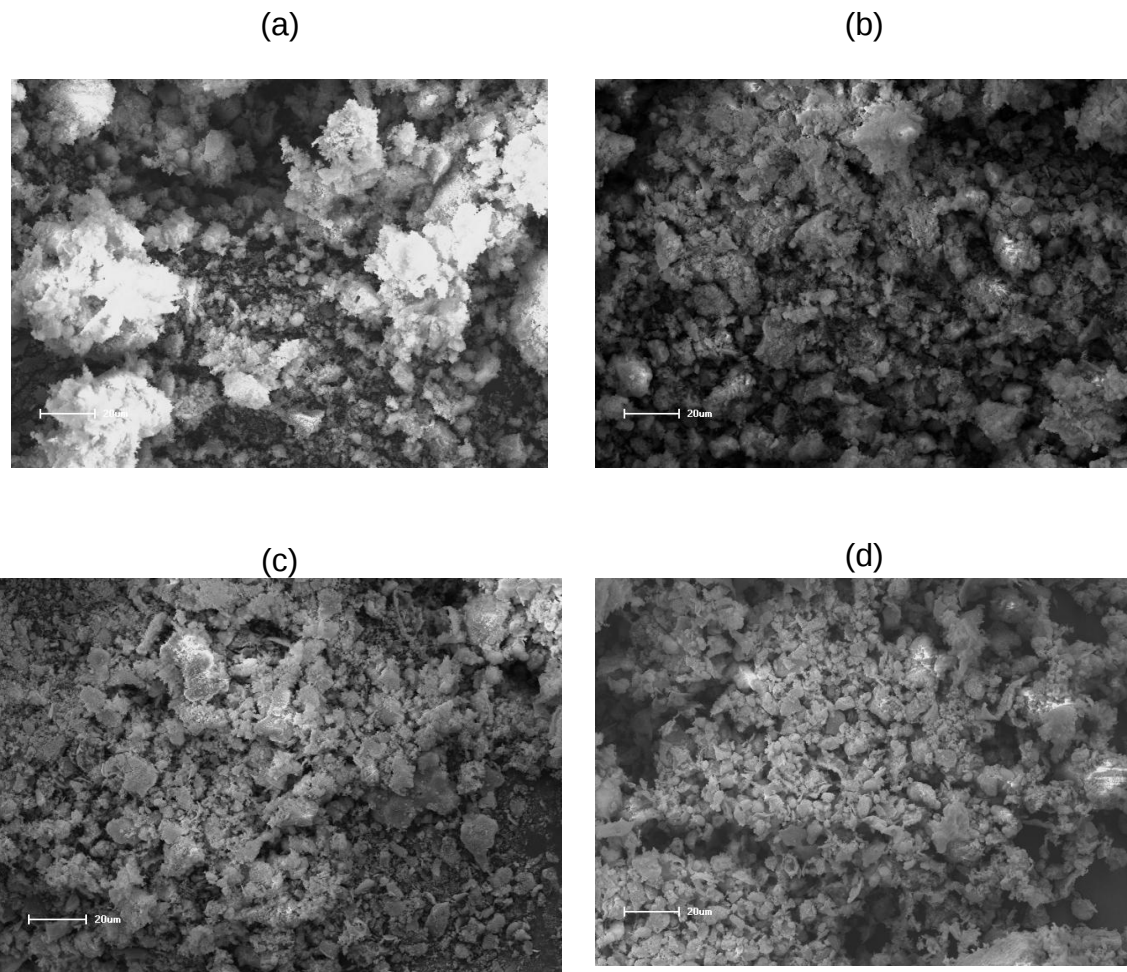


Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA liofilizados e calcinados, sem incorporação de gentamicina (a), e com incorporação de gentamicina, P.E.x% Gent, sendo x: (b) 1%, (c) 0,5% e (d) 2,0%.

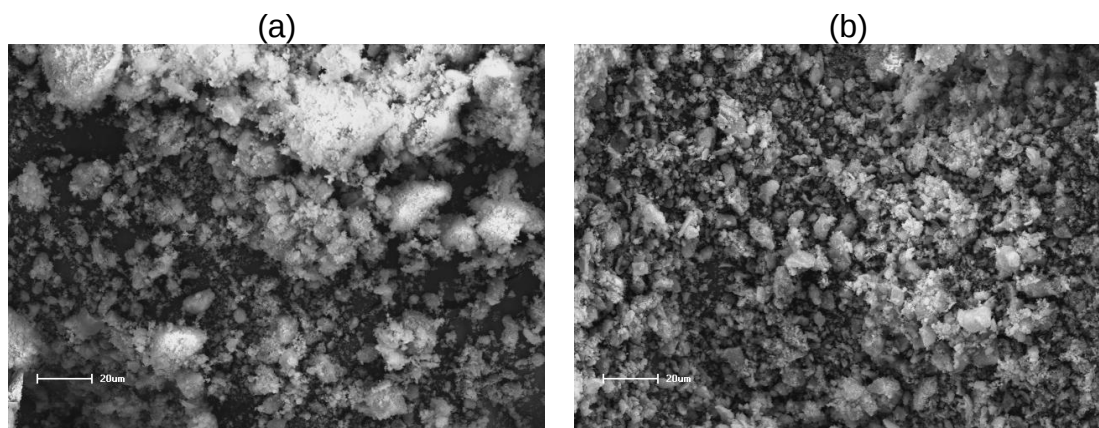


Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA:Gel, secos em estufa e calcinados , sem incorporação de gentamicina (a) e (b) com incorporação de 1% em massa de gentamicina, P.E.1,0% Gent.

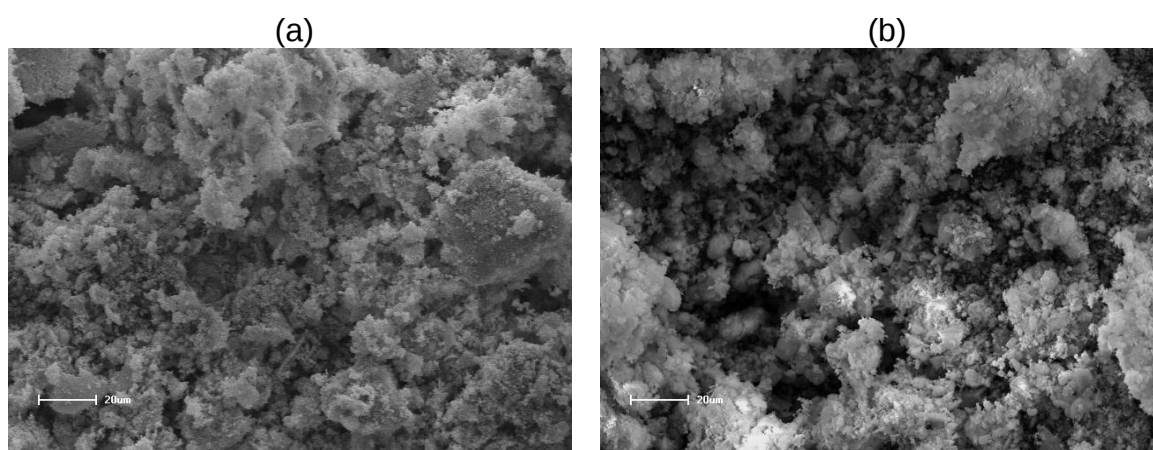


Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura (MEV - aumento 500x) dos pós de HA:Gel liofilizados e calcinados, sem incorporação de gentamicina (a) e b) com incorporação de 1% em massa de gentamicina, P.E.1,0% Gent.

Por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas análises microscópicas de superfície dos pós de HA e HA:Gel com impregnação e sem impregnação de gentamicina . Observamos que o pó é composto por pequenas partículas, formando diversos aglomerados. (ARAÚJO et al, 2007). Estudos demonstram que nas hidroxiapatitas sintéticas, similares a ossos e dentes, os íons carbonato localizam-se em canais e ocupam os mesmos sítios dos íons fosfatos

numa razão de 10:1. A substituição de um grupos fosfato da célula unitária de HA por um grupo carbonato, faz com que a razão molar Ca/P suba de 1,67 para 2,00. Como o material foi produzido em atmosfera aberta e solução aquosa, é provável que tenha havido incorporação de CO_3^{2-} provenientes do ar, isto explicaria o desvio da estequiometria da amostra, sem no entanto haver modificações estruturais perceptíveis no padrão de difração.(MIYAKE et al, 1990).

A tabela 10 contém os resultados dos átomos identificados através das análises de EDS.

Tabela 10: Resultados dos átomos identificados no (MEV-EDS).

AMOSTRAS	ÁTOMOS
HÁ. P. E. 1% GENT.	C,N,O,P,Ca
HA. P.L. 1% GENT.	C,N,O,P,Ca
HA.GEL.E.1% GENT.	C,N,O,P,Ca
HA.GEL.L.1%GENT.	C,N,O,P,Ca
HA. P.E. 0,5%GENT.	C,N,O,P,Ca
HÁ. P.L . 0,5% GENT.	C,N,O,P,Ca
HÁ. P. E. 2,0%GENT.	C,N,O,P,Ca
HA. P. L. 2,0%GENT.	C,N,O,P,Ca
HA. P. E.	O,P,Ca
HA. P. L.	O,P,Ca
HA. GEL. E.	C,N,O,P,Ca
HA. GEL. L.	C,N,O,P,Ca

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDS) observa-se uma relação Ca/P para os pós analisados, resultantes de valores superiores para os íons de Ca e inferiores para os de P, fazendo com que os números calculados para a razão Ca/P sejam maiores que os teóricos, podendo ser confirmado na Figura 30.

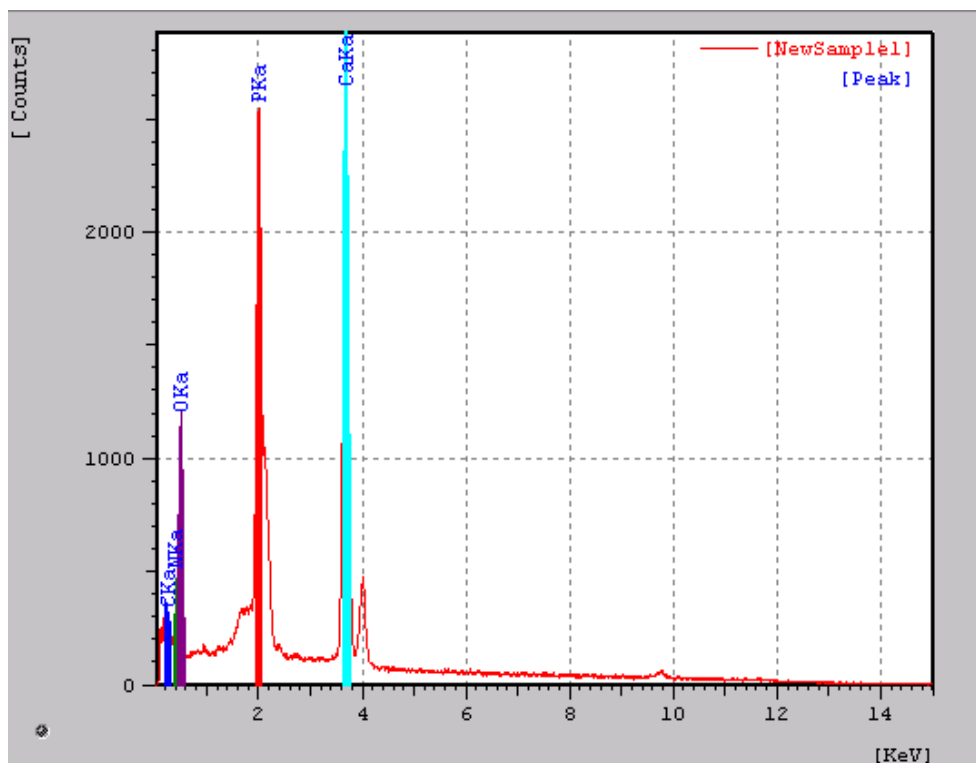


Figura 28: Gráfico de EDS da amostra HA. P. L. 2,0%GENT.

Através do mapeamento MEV-EDS podemos identificar os átomos de Ca e P respectivos a hidroxiapatita e os átomos C, O e N que correspondem ao sulfato de gentamicina impregnado na amostra HA.P.L. 2,0 Gent., de acordo com a Figura 29.

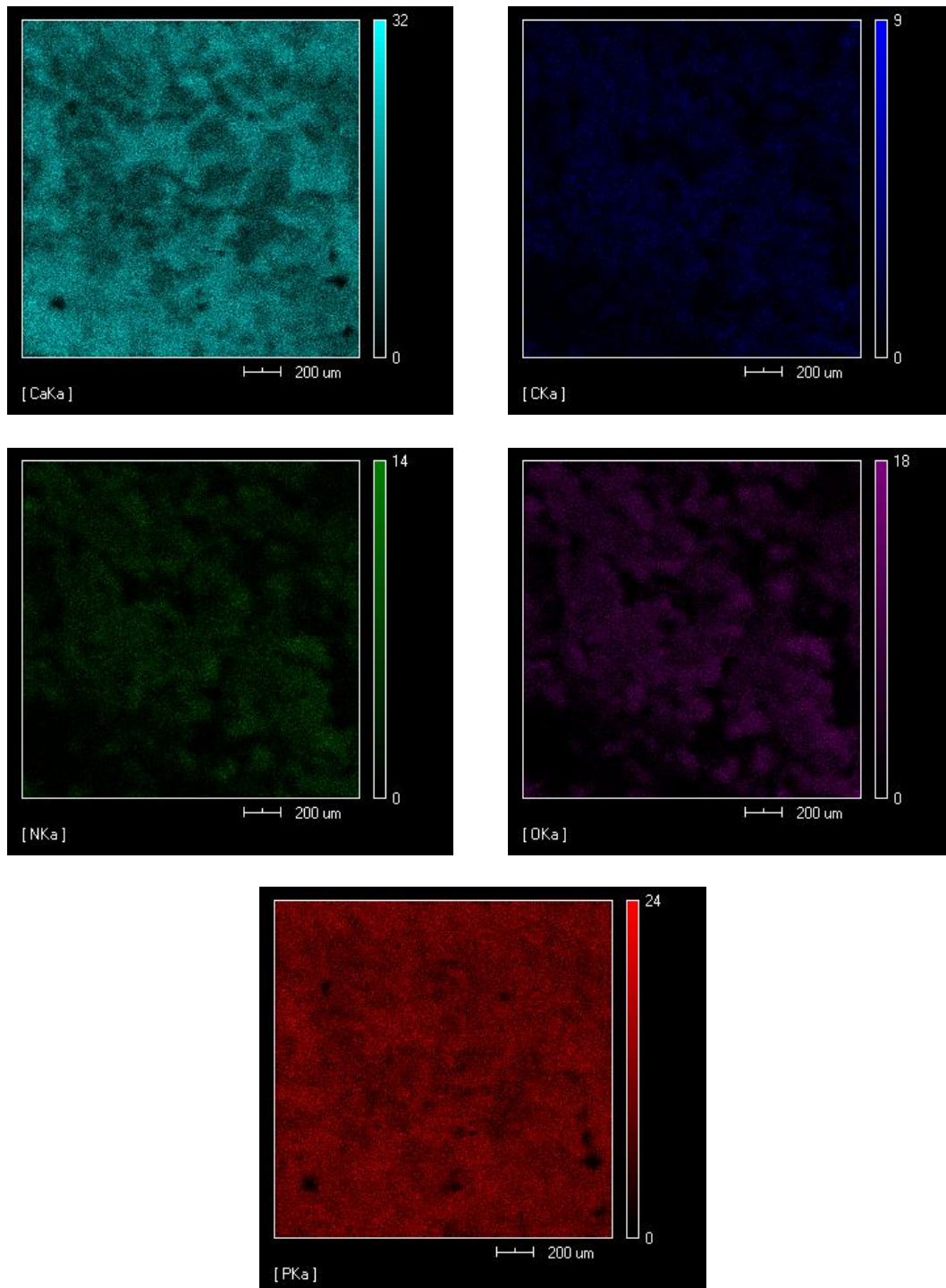


Figura 29: Átomos identificados na amostra HA. P. L. 2,0%GENT (MEV-EDS).

4.7 4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram realizadas em duas etapas, sendo que em ambas o procedimento foi o mesmo. Os tubos foram preparados com saliva+BHI+HA e/ou HA:Gel (e controle) dos quais foram feitas contagens em triplicata (24 e 48 horas das mesmas placas).

4.8.1 Etapa um

A Tabela 11 apresenta os resultados das contagens de UFC/mL referentes a primeira etapa, nas amostras de HA e HA:Gel (controle) calcinadas, sem impregnação de gentamicina e com impregnação de gentamicina.

Tabela 11: Contagens em triplicata (24/ 48 horas) da etapa um dos pós calcinados de HA e HA:Gel e controle, sem impregnação de gentamicina e com impregnação de gentamicina.

AMOSTRAS		Contagem 24 horas			Contagem 48 horas		
		(UFC/mL)			(UFC/mL)		
		A	B	C	A	B	C
Etapa 1	Controle	630	610	620	630	610	620
	HA. P. E.	3370	450	1110	3370	450	1110
	HA.P.E.1%Gent.	0	0	0	0	0	0
	HA.P.E.0,5%Gent.	0	0	0	0	0	0
	HA.P.E.2,0%Gent.	0	0	0	0	0	0
	HA. P. L	2610	2170	2900	2610	2170	2900
	HA.P.L.1%Gent.	0	0	0	0	0	0
	HA.P.L.0,5%Gent.	0	0	0	0	0	0
	HA.P.L.2,0%Gent.	0	0	0	0	0	0
	HA. GEL. E.	260	790	130	260	790	130
	HA.GEL.E.1%Gent.	0	0	0	0	0	0
	HA. GEL. L.	0	450	960	0	450	960
	HA.GEL.L.1%Gent.	0	0	0	0	0	0

Através da análise dos dados da Tabela 11 nota-se que não ocorreu o aumento na contagem de bactérias com o tempo de 48 horas. Observa-se também na tabela 11 que não ocorreu o crescimento de nenhuma colônia de bactérias nas amostras de HA e HA:Gel com impregnação de gentamicina em diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 2,0%). Verifica-se também que nos pós de hidroxiapatita, obtidos na presença de gelatina, houve uma redução no crescimento de bactérias quando comparadas a hidroxiapatita pura. Esse resultado, provavelmente, está relacionado com as propriedades morfológicas dos pós obtidos evidenciando a importância do controle do método de preparação dos pós de HA.

A Figura 30 apresenta as contagens UFC/mL da etapa um, respectivos ao controle positivo (saliva + BHI) e controle negativo (BHI).

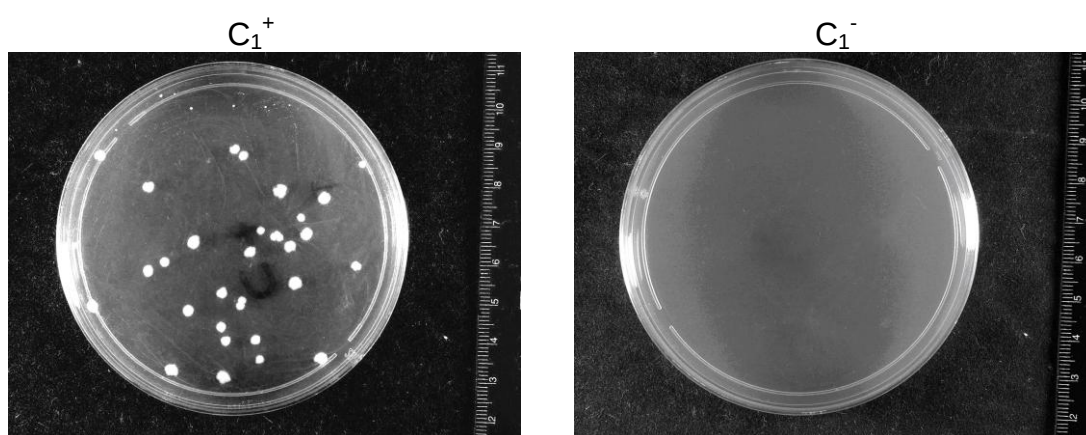


Figura 30: Controle positivo e controle negativo das amostras de saliva coletadas na etapa um.

Confirma-se na Figura 30 o crescimento de colônias de bactérias no C^+ , bem como, a ausência das mesmas no C^- .

Na Figura 31 observa-se os resultados das amostras biológicas de HA secas em estufa e calcinadas a 700°C , sem impregnação de gentamicina e com impregnação de gentamicina em diferentes porcentagens em massa (0,5, 1 e 2 %).

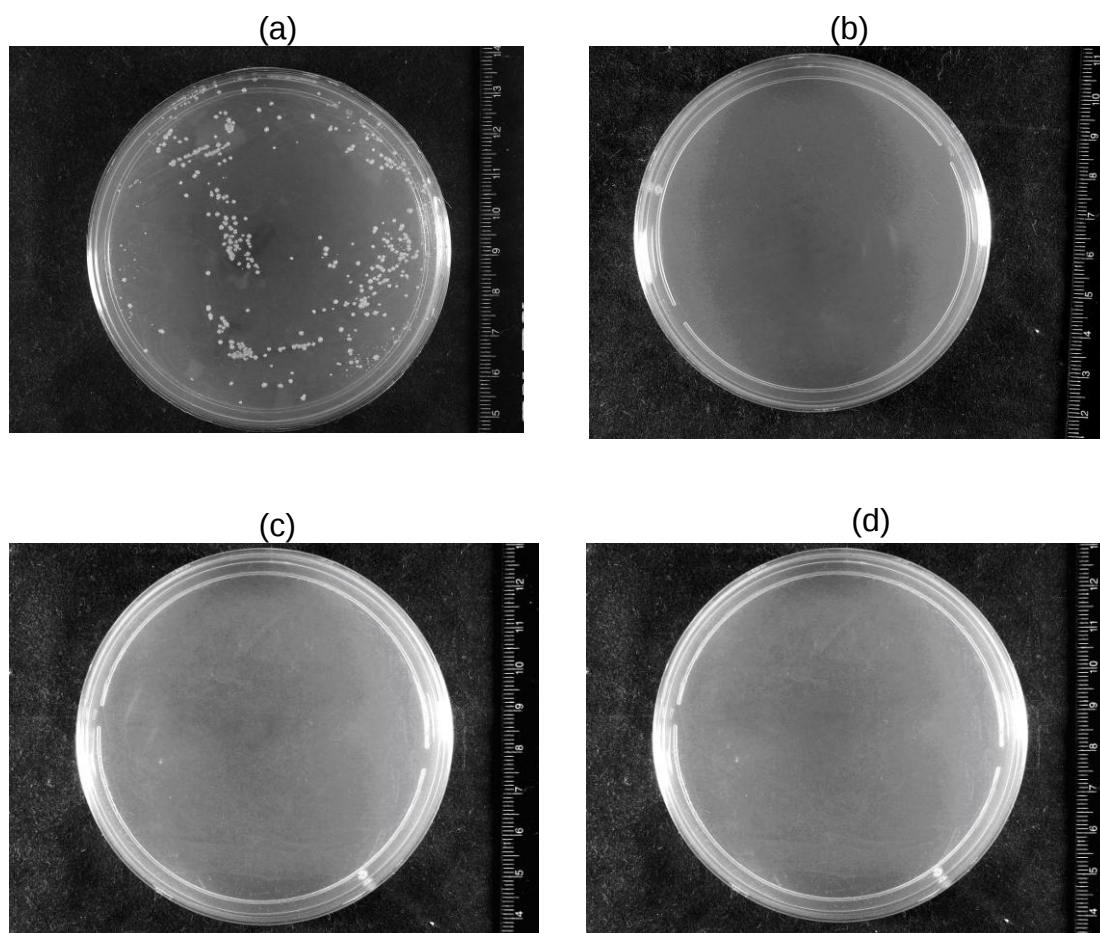


Figura 31: Resultado das amostras biológicas de HA secas em estufa e calcinadas, sem impregnação de gentamicina (a) e com x% de gentamicina impregnada sendo x: b) 0,5, c) 1,0 e d) 2.

A Figura 32 apresenta os resultados das amostras biológicas de HA liofilizadas e calcinadas a 700°C, sem impregnação de gentamicina e com impregnação de gentamicina em diferentes porcentagens em massa (0,5, 1 e 2 %).

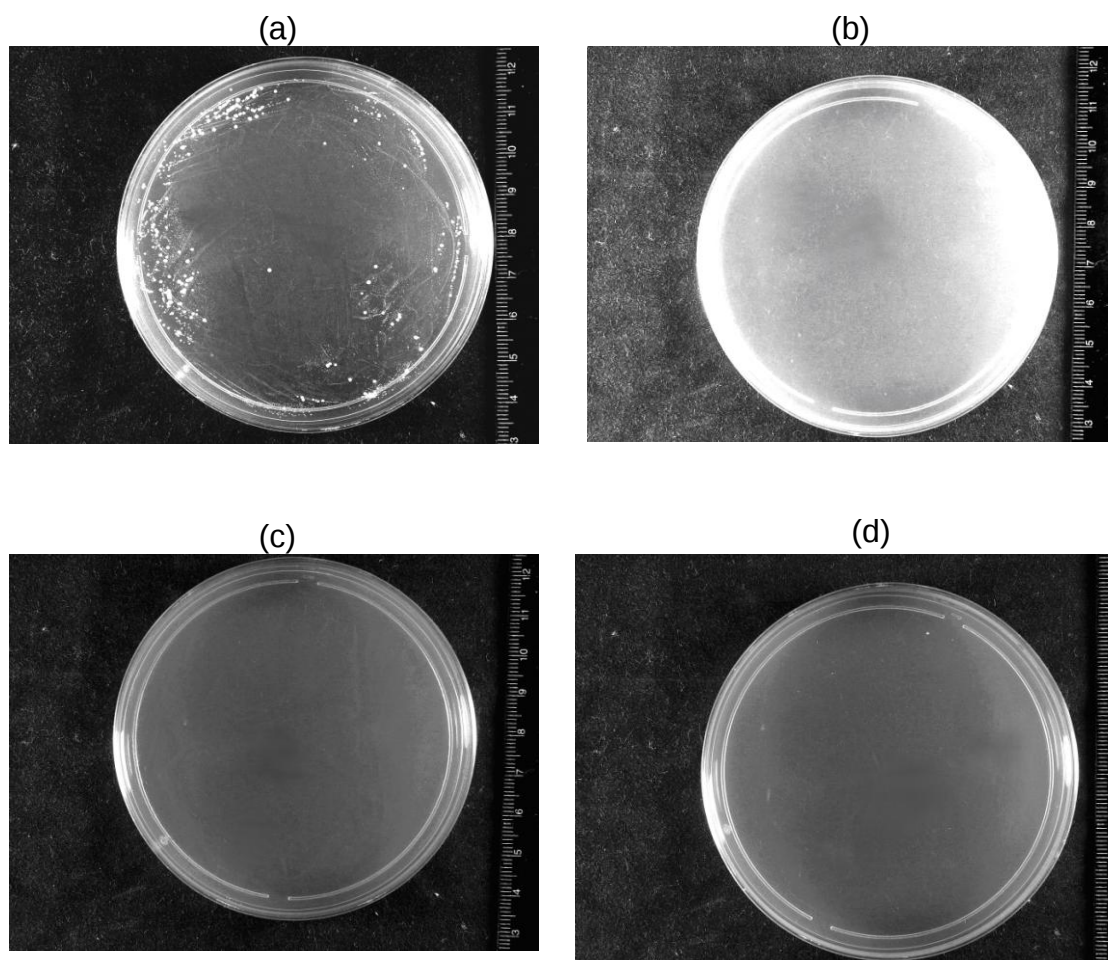


Figura 32: Resultado das amostras biológicas de HA liofilizadas e calcinadas , sem impregnação de gentamicina (a) e com x% de gentamicina impregnada sendo x: b) 0,5, c) 1,0 e d) 2.

Na Figura 33 observa-se os resultados das amostras biológicas de HA:Gel secas em estufa e calcinadas a 700°C, sem impregnação de gentamicina e com impregnação de 1 % em massa de gentamicina.

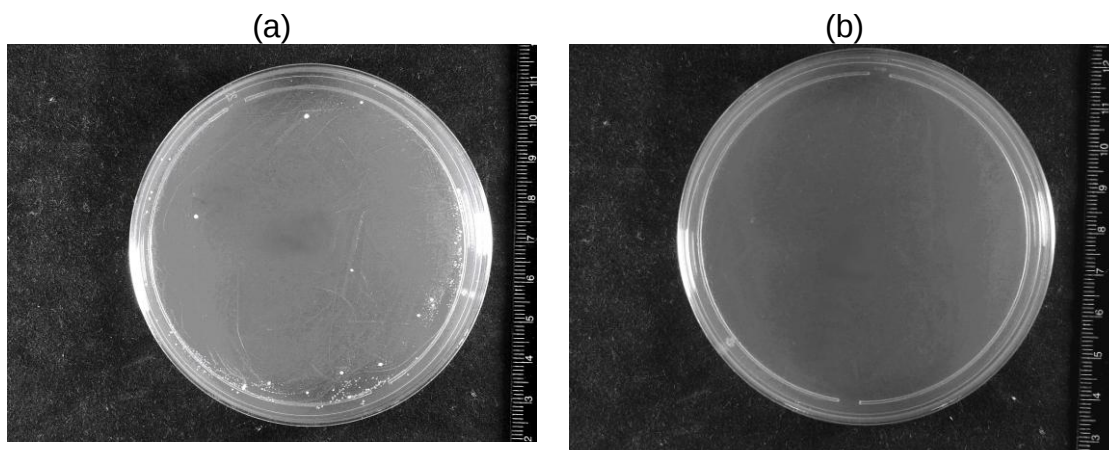


Figura 33: Resultado das amostras biológicas de HA:Gel, secas em estufa e calcinadas, sem impregnação de gentamicina (a) e com incorporação de 1,0% de gentamicina (b).

Na Figura 34 observa-se os resultados das amostras biológicas de HA:Gel liofilizadas e calcinadas a 700°C, sem impregnação de gentamicina e com impregnação de 1 % em massa de gentamicina.

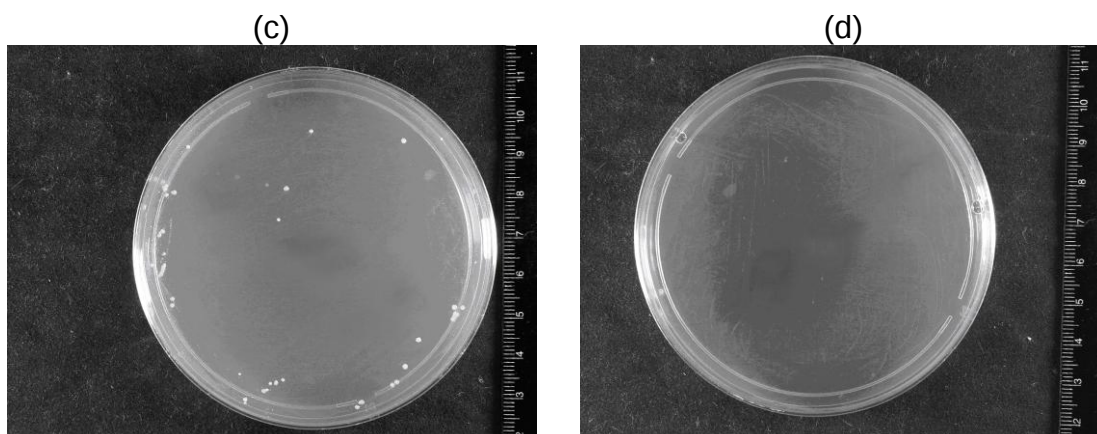


Figura 34: Resultado das amostras biológicas de HA:Gel, liofilizadas e calcinadas, sem impregnação de gentamicina (a) e com incorporação de 1,0% de gentamicina (b).

As figuras 31, 32, 33 e 34 comprovam a ausência de bactérias nas amostras de HA em diferentes porcentagens em massa de sulfato de gentamicina (0,5, 1 e 2 %) e HA:Gel com 1% em massa de sulfato de gentamicina. Observa-se que nas amostras (HA e HA:Gel) que não foram impregnadas gentamicina ocorreu o crescimento de colônias.

4.8.2 Etapa dois

Com o objetivo de verificar se uma menor concentração de gentamicina teria o mesmo efeito e, que a diminuição das bactérias não estariam relacionadas com a desaglomeração dos pós em ultrassom, as amostras foram submetidas a novos ensaios microbiológicos sem impregnação de gentamicina submetidas ao ultrassom e com impregnação de 0,25% em massa de gentamicina.

A Tabela 12 apresenta os resultados das contagens em triplicata (24/ 48 horas) da etapa dois dos pós calcinados de HA, HA:Gel submetidas ao ultrassom (e controle), sem impregnação de gentamicina e com impregnação de 0,25% em massa de gentamicina.

Tabela 12 : Contagens em triplicata (24/ 48 horas) da etapa dois dos pós calcinados de HA e HA:Gel e controle, sem impregnação de gentamicina e com impregnação de 0,25% em massa de gentamicina.

AMOSTRAS		Contagem 24 horas (UFC/mL)			Contagem 48 horas (UFC/mL)		
		A	B	C	A	B	C
Etapa 2	Controle	6360	18690	2060	6480	18790	1050
	HA.P.E.Ultrassom	2510	2460	9200	2950	2800	9470
	HA.P.E.0,25% Gent.	40	30	80	40	30	80
	HA.P.L.Ultrassom	2650	9230	2940	2650	9350	2940
	HA. P.L.0,25%Gent.	40	10	30	40	10	30
	HA.Gel.E.Ultrassom	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
	HA.Gel.E.0,25% Gent.	0	0	0	0	0	0
	HA. GEL.L.Ultrassom	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
	HA. Gel.L.0,25% Gent.	30	0	20	30	0	20

Observa-se na Tabela 12 que a única amostra que não ocorreu o crescimento de colônias de bactérias é a HA.Gel.E.0,25% Gent.

A Figura 35 apresenta as contagens respectivas a etapa dois: controle positivo (saliva + BHI) e controle negativo (BHI).

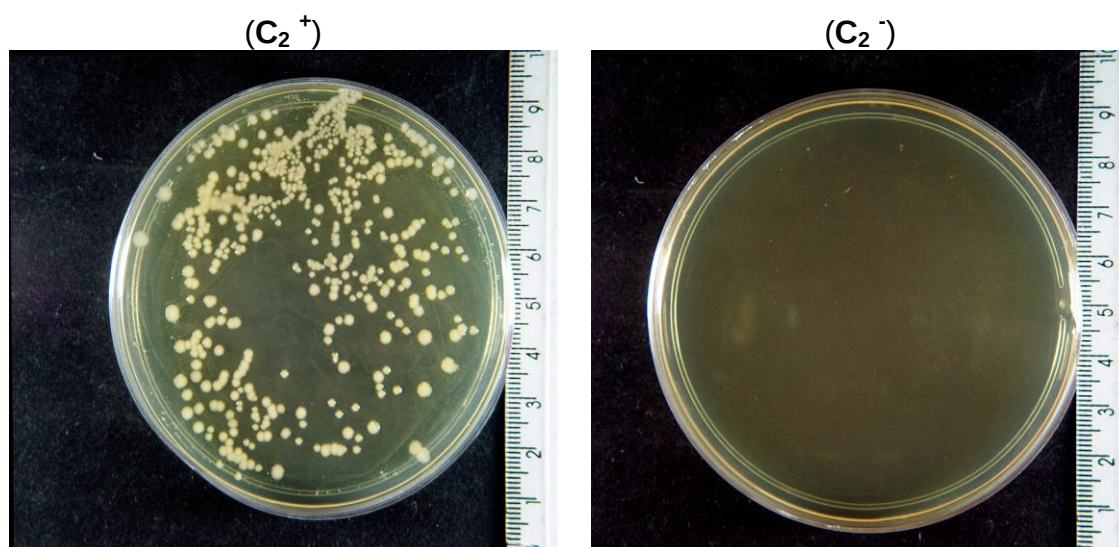


Figura 35: Controle positivo e controle negativo das amostras de saliva coletadas na etapa dois.

Na Figura 35 ocorreu crescimento de colônias de bactérias no C_2^+ , sendo que no C_2^- , não cresceu nenhuma colônia.

A Figura 36 apresenta os resultados das amostras biológicas de HA secas em estufa e calcinadas com impregnação de gentamicina (HA.P.E.0,25% Gent.) e sem impregnação de gentamicina, apenas submetidas ao ultrassom (HA.P.E.Ultrassom).

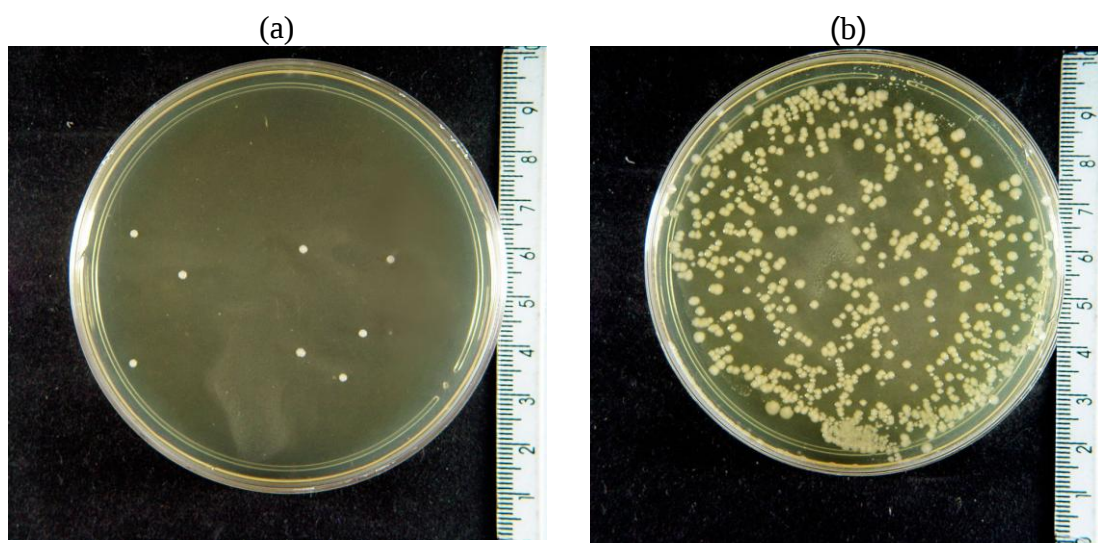


Figura 36: Resultado das amostras biológicas de HA secas em estufa e calcinadas com incorporação de gentamicina (a) e sem incorporação de gentamicina (b).

Na Figura 37 observa-se os resultado das amostras biológicas de HA:Gel, secas em estufa e calcinadas com incorporação de gentamicina (HA.P.E.0,25% Gent.) e sem incorporação de gentamicina (HA.P.E.Ultrassom.).

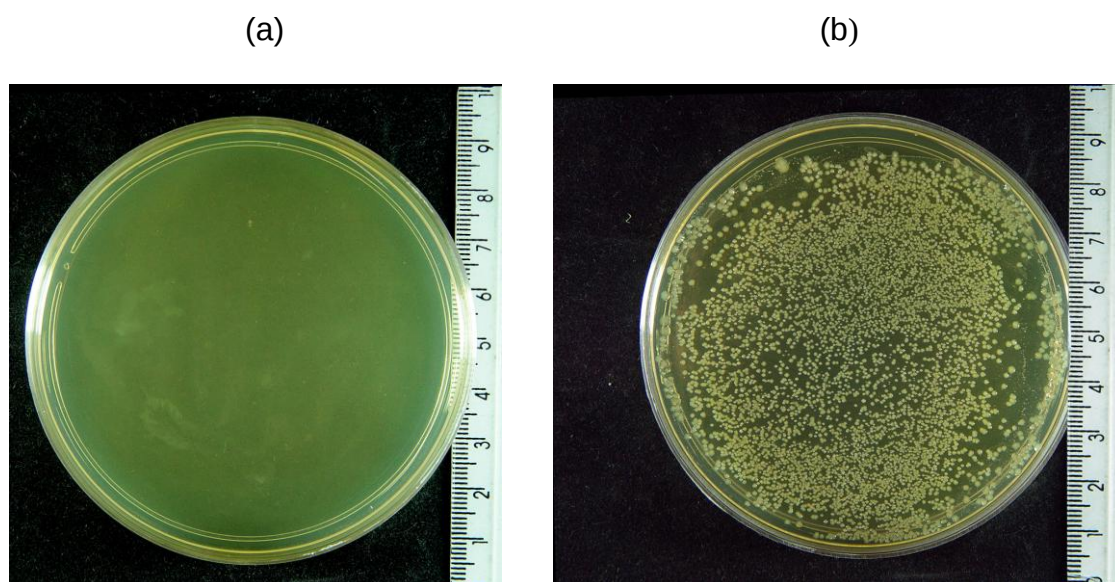


Figura 37: Resultado das amostras biológicas de HA:Gel, secas em estufa e calcinadas com incorporação de gentamicina (a) e sem incorporação de gentamicina (b).

A Figura 37 comprova que houve a inibição total de crescimento bacteriano na amostra HA:Gel seca em estufa com impregnação de 0,25% em massa de sulfato de gentamicina (HA.P.E.0,25% Gent.).

Os resultados das amostras biológicas de HA:Gel, liofilizadas e calcinadas com incorporação de gentamicina (HA.P.E.0,25% Gent.) e sem incorporação de gentamicina (HA.P.E.Ultrassom) são observados na Figura 38.

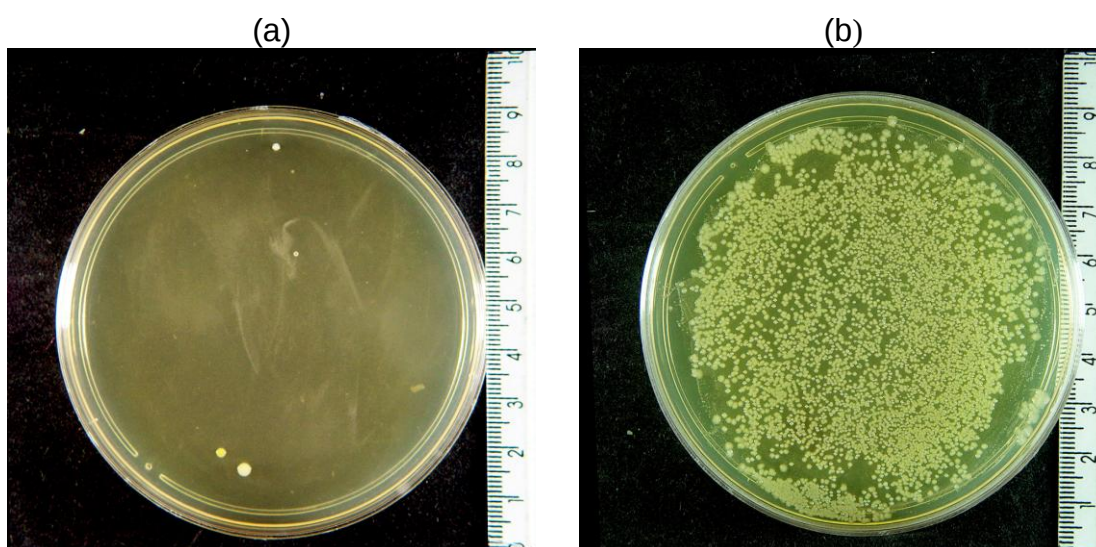


Figura 38: Resultado das amostras biológicas de HA:Gel, liofilizadas e calcinadas com incorporação de gentamicina (a) e sem incorporação de gentamicina (b).

Verifica-se na Figura 38 que a impregnação de 0,25% em massa de sulfato de gentamicina, nas amostras HA:Gel liofilizadas e calcinadas, ocorreu uma diminuição relevante no crescimento das bactérias, porém, não total.

5. CONCLUSÕES

Os pós preparados, neste trabalho, pelo método da precipitação são cristalinos e nanométricos. Pela análise de infravermelho e difração de raios X observa-se que os pós obtidos sem e com calcinação apresentam uma estrutura apatítica carbonatada com a fase predominante de hidroxiapatita. A Microscopia eletrônica de varredura ilustra que os pós de hidroxiapatita após a calcinação são formados por aglomerados de partículas HA. Pelos resultados obtidos de contagens de UFC/mL ficou evidenciado a influência do método de preparação e da secagem, portanto, da morfologia dos pós obtidos no crescimento bacteriano, assim como o próprio efeito das partículas de HA na inibição do mesmo. A impregnação de 0,5 a 2,0% em massa de sulfato de gentamicina mostrou-se eficaz na inibição total do crescimento bacteriano em todas as amostras obtidas depois da calcinação.

Seguindo a tendência atual à procura por um material biocompatível e biodegradável de liberação controlada de fármacos, na amostra HA:Gel seca em estufa com impregnação de 0,25% em massa, houve a inibição total de crescimento bacteriano, mostrando-se um biomaterial promissor para possível substituição óssea, devido a utilização da gelatina no método de preparação e da menor porcentagem utilizada do antibiótico.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Produção de apatitas submetidas à vibração constante do ultrassom
- Estudos “in vivo” do biomaterial obtido.
- Estudo da liberação controlada do antibiótico.

7 REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. **Apatite coatings on ceramics, metals and polymers utilising a biological process**. RJ. Mater. Sci.: Mater. Med., v. 1, p. 536-540, 1990.
- ALMEIDA, J.M.V.; et al. **Avaliação da adesão de hidroxiapatita sobre implantes metálicos utilizando jato com suspensão de bicarbonato**. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v18, nº 3, 2002.
- ANDRADE, L. R. **Biomateriais Utilizados em Bioengenharia Ortopédica**. Estudos de Biologia, vol. 8, nº 63, p.17-23, 2006.
- 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.
- ARAÚJO, J.C.; et al. **Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios-x**. Quim. Nova, vol.30, Nº 8.1853-1859, 2007.
- ARAUJO, T.S. **Produção de Hidroxiapatita Pura e Dopada para Aplicação em Biosensores**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, 2006 .
- ASTM F 1185/88, Standard **“Specification for Composition of Ceramic Hydroxiapatite for Surgical Implants”**.
- ATKINS, P. Líquidos e Sólidos. In: **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, p. 337-338. 2001.
- AUGTHUM, M.; CONRADS, G. **Microbial findings of deep peri-implante bone defects**. Int J Oral Maxillofac Implants, Lombard, v.12, n.1, p.106-112, 1997.
- BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A.; **Ultra-som(I): influência do ultra-som na química**. Quím. Nova. V. 15(4), p. 302-316.1992.
- BARHAM, P. **The Science of Cooking**, Springer-Verlag. 2000.
- BASTOS, E.G. **Análise química, microestrutural e da interface implante – pilar intermediário de quatro sistemas de implantes dentários endo-ósseos**.113p. Tese(doutorado em clínica Odontológica – Área de Cirurgia Bucomaxilofacial). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba, 2001.
- BECK, H. **Estudo do comportamento mecânico de cerâmicas de CeO₂-ZrO₂-Al₂O₃ consolidadas com vidro e por infiltração, visando aplicações**

estruturais.141p. Dissertação (Mestrado em Engenharias e Tecnologias Espaciais), São José dos Campos: INPE,2006.

BERTINO, J.S.; RODVOLD, K.A.; DESTACHE, C.J. **Cost considerations in therapeutic drug monitoring of aminoglycosides.** Clin. Pharmacokinet., Auckland, v.26, n.1, p. 71-81, 1994.

BIER, O. **Fisiologia bacteriana. In: microbiologia e Imunologia.** 23.ed. São Paulo, melhoramentos, 1984. cap.3,p.43-77. 1984.

Biocerâmicas Tradicionais e Inovadoras, incluindo Alumina, Zircônias, Hidroxiapatita e Compósitos, Disponível em: <<http://www.biomateriais.blogspot.com> >. Acesso em: 15 de janeiro de 2008.

BOIKO, J.; et al. **Estudo da influência da adição de colágeno na síntese da hidroxiapatita.** XVI Encontro de Química da Região Sul-Florianópolis-SC. 2008.

BOHNER, M., LEMAITRE, J. P. VANLANDUYT, P.Y. ZAMBELLI, H.P. MERKLE, GANDER, B. : **Gentamicin-Loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system.** Journal of Pharmaceutical Sciences, 86 (5), 565-572, 1997.

BORGES, F.S. **Elementos de Cristalografia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. p. 265 e 285, 1980.

BROZ, J.J.; SIMSKE, S.J.;GREENBERG, A.R. **Material and compositional properties of selectively demineralized cortical bone.** Journal of Biomechanics, V 28, P.1357-1368. 1995.

BROWN, W.E. y CHOW, L.C. **A new calcium phosphate setting cement.** Journal of Dental Research, 62, 672. – 1983.

CALLISTER, W.D.J. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.** 5ªed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

CAMPOS, D.M.; SENA, L.A.; SOARES, G.A. **Produção de compósitos baseados em colágeno-hidroxiapatita para regeneração óssea.** 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. P. 170-173. 2007.

CANO, J. M., et al. **Sulfato de calcio associado à gentamicina como material de substituição óssea.** Rev Bras Ortop – Vol. 34, Nº 5 – Maio, 1999.

CHANG, M.C., KO, Ching-Chang y DOUGLAS, W.H. **Preparation of hydroxyapatite – gelatin nanocomposite.** Biomaterials, v. 24, p. 2853-2862, 2003.

CHUANG, H.F.;SMITH, R.C.; HAMMOND, P.T. **Polyelectrolyte Multiayers for Tunable Release of Antibiotics.** Biomacromolecules, Vol. 9, No. 6, p. 1660-1668. 2008.

CIENFUERGOS, F.;VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2000.

CORREIA, L.F.; ALVES, G. **Auto e xenoernxertos na prática clínica implantológica**. Portugal Implantologia, 1, 2002.

CRISTAIS GEMINADOS. Disponível em: <<http://www.tele.ed.nom.br/rx/twin14.html>>. Acesso em: 16, jun. 2009.

CRYSFIRE. Disponível em:<<http://www.ccp14.ac.uk/ccp/web-mirrors/crys-r-shirley/>>.Acesso em dezembro de 2007.

CULLITY, B. D. **Elements of x ray diffraction**. Second edition Addison – Wesley publishing company inc 1978.

DACQUET, V.; VARLET, A.; TANDOAN,R.N. TAHON, M.M. FOURNIER,L .; JEHL, F.; MONTEIL, H.; BASCOULERGUE ,G. : **Antibiotic-impregnated plaster of Paris beads. Trials with teicoplanin**. Clin. Orthop. Rel. Res., 282, 241-249.,1990.

DAHNER, L. E.; FUNDERBURK, C.H.: **Gentamicin-loaded plaster of Paris as a treatmen of experimental osteomyelitis in rabbits**. Clin. Orthhop., 219, 278-282.1987

DEL LAMA, E. A.; KIHARA, Y. **Biocerâmicas. Fundamentos de Mineralogia Aplicada**. Universidade de São Paulo, maio 2003.

DIFRAÇÃO DE RAIOS X: Monocristais. Disponível em:<<http://ca.iq.usp.br/conteudo2.php>>. Acesso em: 16, jun. 2009.

DOMINGUES, R.Z.; ANDRADE, A.L. **Cerâmicas Bioativas-Estado da Arte**. Química Nova, Vol. 29, nº1, p 100-104, 2006.

E'GUES, M. A. M. **Compósito de Colágeno com Silicato e hidroxiapatita como material para Endodontia, 2005**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de química de São Carlos, USP, 2005.

EISENBERGER, P. **Biomaterials and medical implant science: present and future perspectives:a sumary report**. J. Biomed. Mater. Res., v.32, p. 143-147, 1996.

ELLIOT, J.C. **Structure and Chemistry of the Apatite and Other Calcium Orthophosphates**, 1 edition, Amsterdam, Elsevier, 1994.

ENSING, G.T., et al. **The Influence of Ultrasound on the Release of gentamicin from Antibiotic-Loaded Acrylic Beads and Bone Cements**. Wiley InterScience. 2005.

EVIS, Z. **Increased osteoblast adhesion on nanograined hydroxyapatite and partially stabilized zirconia composites**, Journal of Biomedical materials Research Part A DOI 10.1002/jbm.a.30750 p. 500-507, 2006.

FERREIRA, F. R.; et al. **Avaliação microbiológica de hidroxiapatita associada a sulfato de gentamicina.** XVI Encontro de Química da Região Sul-Florianópolis-SC. 2008.

FERREIRA, F. R. **Síntese, caracterização e aplicação biológica de hidroxiapatita: em presença de gelatina e associada a sulfato de gentamicina.** Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

FERRIGNO, C.R.A.; MASTROCINQUE, S.; TATARUNAS, A. C.; ZERWES, M. B. C.; QUEIROZ, G. F.; SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M. **Proteínas ósseas morfogenéticas e outros fatores de crescimento ósseo.** Ciências Agrárias, Londrina, v. 25, n.2, p. 139 – 150, abr./jun.2004.

Fibrogen. Disponível em: <<http://www.fibrogen.com/collagen/>>. Acesso em: 29, jun/2009.

FOLKMANN, J. **How the field of the controlled release technology began, and its central controlled role in the development of an angiogenesis research.** Biomaterials, v. 11, p. 615-618 . 1990.

FOOK, A. C. M. B.; **Desenvolvimento de Biocerâmicas Porosas Para Regeneração Óssea.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Engenharia de Materiais), Centro de Ciências e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

GARCIA, A.; SPIN, J.A.; SANTOS, C.A. **Ensaio dos Materiais.** Rio de Janeiro: Editora LTC, cap.4 e 6.2000.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia.** 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003.

GEDANKEN, A. **Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials.** Ultrasonic Sonochemistry. V 11. p. 47-55.2004.

GILBERT, D.N. **Aminoglycosides.** In: Mandell, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R., eds. Principles and practice of infectious diseases. 4 th ed. New York: Churchill Livingstone; p.279-306.1995.

GIMENES, R. **Preparação e caracterização de compósitos polímero/cerâmica com potencial de aplicações médicas.** Tese de Mestrado, Araraquara, 2001.

GITELIS, S.; BREBACH, G.T.: **The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant.** J. Orthop. Surg., 10, 53-60. 2002

GLEITER, H. Nanostructured materials: **basic concepts and microstructure.** Journal Materials Processing Technology, v.48, n.1, p.1-29, 2000.

GOUVEIA, D.S., BRESSIANI, D.S.H.A., BRESSIANI, J.C. **Efeito do carbonatado durante a síntese da hidroxiapatita.** 17^a CBEIMat : Foz do Iguaçu, PR, Brasil. 2006.

GROSS, K. A.; BERNDT, C. C.; GOLDSCHILAG, D.D.; IACONO. V. **In vitro changes of hydroxyapatite coatings.** Quintessence, v. 12, p. 589-597, 1997.

HAAR T. G. Therapeutic applications of ultrasound. Progress in Biophysics and Molecular Biology .V 93, p 111-129. 2007.

HENCH, L. L.; WILSON, J.; **Introduction to bioceramics.** Word Scientific. Singapore, 1993.

HONG, Z.; et al.**Characterization of Crystalline Hydroxyapatite Thin Coatings for Biomedical Applications.** Key Engineering Materials vols.330-332 p.525-528.2007.

IVANOVA, T.I.; FRANK-KAMENETSKAYA, O.V.; KOL'TSOV, A.B.;UGOLKOV,V.L.**Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite.** Thermal Decomposition, Journal of Solid Chemistry, vol. 160, p. 340-349. 2001.

Introdução teórica a espectroscopia vibracional infravermelho. Disponível em: < [http:// www.angelfire.com/ab/prvs/infrav.htm](http://www.angelfire.com/ab/prvs/infrav.htm) >Acesso em: 09 de janeiro de 2008.

Introdution Optical Microscopy. Disponível em: <<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>>. Introduction to Optical Microscopy, Digital Imaging, and Photomicrography>. Acesso em: 18, jun/2009.

IOKU, K., YOSHIMURA, M., SÖMIYA, S., **Microstructure and mechanical properties of hidroxiapatite ceramics with ziconia dispersion prepared by post-sintering,** Biomateriais, vol.11, p. 57 – 67, 1990.

JINGBING, L. J.; XIAOYUE, Y.; HAO, W.; MANKANG, Z.; BO, W.; HUI, Y. **The influence of pH and Temperature on the Morphology of Hydroxyapatite Synthesized by Hydrothermal Method.** Ceramics International, v. 29, p. 629-633, 2003.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO J. **Histologia Básica.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KAWACHI,E.Y, et al. **Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma área interdisciplinar.** Química Nova, 23 (4), 2000.

KESTENBACH,H.J.;BOTTA,W.J.F. **Microscopia eletrônica: transmissão e varredura.** São Paulo: Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais, 1994.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica, 1^a. Edição.** Rio de Janeiro: Guanabara Dois, p.5757-578 e 601-603. 1982.

Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos. Disponível em: www.demet.ufmg.br/.../rodrigo/biomateriais.html. Acesso em: 15, jul/2009.

LACERDA, K.A; LAMEIRAS, F.S.; SILVA, V.V. **em braquiterapia.** Revista Escola de Minas, Ouro Preto, 59 (2), 2006. **Síntese e caracterização de matrizes porosas de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas**

LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; VICHI, L.; SANDRI, M. **Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite.** Biomaterials, v. 25, p. 1763-1770, 2004.

LAWSON, A. C.; CZERMUSKA, J.T.; **Proc.Inst. Mech. Eng.** 212, p. 413-425 (1998).

LEE, D.D.; TOFIGHI, A.; AIOLOVA, M.; CHAKRAVARTHY, P.; CATALANO, A.; MAJAD, A.; KNAACK, D.: **Alpha-BSM®: A biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle.** Clinical Orthopaedics and Related Research, 367, S396-S405 Suppl. 1999.

LEGEROS, R. Z.: **Calcium phosphates in oral biology and medicine.** Monographs in Oral Science, 15. Ed: H.M. Myers, Karger, London, p. 110. 1991.

LI, J.; CHEN, Y.; YIN, Y.; YAO, F.; YAO, K. **Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan-gelatin network film in situ.** Biomaterials, v. 28, p. 781-790, 2007.

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.

MACHADO, M.R.O.; SOUZA, K.C.; SOUSA, E.M.B. **Modificação superficial da hidroxiapatita nanoestruturada.** 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica. Salvador-BA. 2007.

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.

MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JÚNIOR, M. J. **O efeito do ultra-som em reações químicas.** Química Nova, V. 23 (2). 2000.

MASON, T. J. **In Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry.** Mason, T. S., Ed.; The Royal Society of Chemistry. Cambridge, 1990..

MAVROPOULOS, E. et I. **A hidroxiapatita como absorvedor de metais.** 105p. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola de Saúde Pública; 1999.

MCLAREN, A.C.; MACLAREN, S.G.; NELSON, C.L. ; WASSELL, D.L. ; OLSEN, K.M. : **The effect of sampling method on the elution of tobramycin from calcium sulfate.** Clin. Orthop. Rel. Res., 403, 54-57. 2002

MCKEE, M.D.; WILD, L. M.; CHEMITSCH, E.H.; WADDELL, J. P.: **The use of antibiotic-impregnated, osteoconductive, bioabsorbable bone substitute in the treatment of infected long bone defects: Early results of a prospective trial.** J. Orthop. Trauma., 16, 622-27. 2002.

MIYAKE, M. et al. **Synthetic carbonate apatites as inorganic cations exchangers.** J.Chem .Soc. Faraday Trans., v 86, n. 12, p. 2303-2306, 1990.

MOREIRA, A. S. B.; PASTORELI, M. T.; DAMASCENO, L. H. F.DEFINO, H. L. A. **Influence od dimensions of hydroxiapatite granules upon bone integration: an experimental study.** Acta ortop. Bras. v.11, n.4, p. 240-250, 2003.

MOUSSET,B.;BENOIT, M.A.;DELLOYE, C.; BOUILLET, R.; GUILLARD,J.: **Biodegradable implants for potential use in bone infection. An in vitro study of antibiotic-loaded calcium sulphate.** Int. Orthop., 19, 157-161. 1995.

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.

OGAWA, C.A.; PLEPIS, A.M.G. **Liberação In Vitro de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno.** Polímeros. v.12, nº2. São Carlos, 2002.

OLIVEIRA, I. R.; STUDART, A.R.; PELEGGI, R. G.; PANDOLFELLI, V.C. **Dispersão e empacotamento de partículas,** Fazendo Arte Editorial, São Paulo, 2000.

ORÉFICE, R. L.; **Biomateriais: fundamentos e aplicações.** Cultura médica, Rio de Janeiro, 2006. 67 p.

PARK, J.B.; **“Biomaterials, An Introduction”** Plenum Press, New York, 1979.

PAZ, R. J.G.; et al. **Caracterización de la interacción colágeno-hidroxiapatita.** Revista Iberoamericana de Polímeros. V. 9(3), maio, 2008.

PIERRI, J.J. **Compósitos de Al₂O₃/ZrO₂ recobertos com hidroxiapatita dopada com íons Ag,** Cerâmicas,São Carlos, n 53, 160-164, 2007.

PANG, Y.X.; BAO, X. **Influence of Temperature Ripening Time and Calcination on the Morphology and Cristallinity of Hydroxyapatite nanoparticles.** Journal of European Ceramic Society, v.23,p. 1697-1704, 2003.

PEIXOTO, Alberto Monteiro.**Apostila do curso de eletrotermofototerapia.** Disponível em http://www.albertomonteiro.com.br/materiais/eletroterapia_completa.pdf/ 2008. Acesso em 06 de julho de 2009.

PEREZ, J. **Estudos Fundamentais e Aplicações Sobre a Reação de Redução de Oxigênio em Platina**, 1997. 93 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – USP, São Carlos, 1997.

PIMENTEL, A.S.; ARBILLA, G. **Cinética não-isotérmica na Análise Térmica dos Sólidos**. Química Nova, Vol. 21, nº3, 1998.

POSNER, A.S.; PERLOFF, A. **Preparation of pure hidroxyapatite crystals**. Science, vol. 124. 583-584, 1956.

QUINTO, A.H. **Caracterización física y química de pastas de cementos óseos com ZrO_2** , Rev.Mex.Fís. 49(2) (2003) 123-131.

RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWAKI, A.; **Bioceramics: materials, Properties, Applications**. Chapman & Hall, 1992.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLANT, D.; THOMAS, P. **Calcium Phosphate Apatites with Variable Ca/P Atomic Ratio I: Synthesis, Characterization and Thermal Stability of Powders**. Biomaterials, v. 23, p. 1065-1072, 2002.

REED, S. J. B., **Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology**, New York: Cambridge University Press. 201 p. 1996.

RIGO, E.C.S.; et al. **Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita**. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica. Vol 15, n1-2, jan/ago 1999.

RIGO, E.C.S.; GEHRKE, A.S.; CARBONARI, M. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação**. Rev. Dental Press Periodontia implantol., Maringá, v. 1, n. 3, p. 39-50, jul./agos./set. 2007.

RING, T. A. **Fundamentals of Ceramic powder Processing and Synthesis**. San Diego: Academic Press, 1996.p.67-78.

ROCHA, L.B. **Estudo de biocompatibilidade de matrizes de colágeno aniônico para reparo de defeitos ósseos**. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. SP. 2000.

RODRÍGUEZ-LORENZO, L.M.; HART, J.N.; GROSS, K.A.; **Influence of fluorine in the synthesis of apatites. Synthesis of solid solutions of hidroxy-fluorapatite**, Biomateriais 24 3777-3785, 2003.

ROSA, A.L.; SHAREEF, M.Y.; NOORT, R.V. **Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita**. Pesqui. Odontol. Brás. v.14, nº3, p. 273-277, jul/set.2000.

ROSSI, J.D.M.B. A ; et al. **Avaliação mecânica de compósitos de hidroxiapatita-polimetilmetacrilato**. Revista Brasileira de Ortopedia. Vol.28, nº3, março,1993.

ROZIAK, J.M.; JANIK, I.; KADLUBOWSKI, S.; KOZICKI, M.; KUJAWA, P.; STASICA, P.; ULANSKI, P. **Radiation formation of hydrogels for biomedical applications**, 1999.

Disponível em: http://mitr.p.lodz.pl/bioma/raport/1_radiation_hydrogels.html. Acesso em: 20 de agosto de 2009.

SALEH, J.; et al. **Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo**. Cbecimat XVI Congresso Brasileira de Engenharia e Ciências de Materiais. Porto Alegre, 2004.

SANTOS, L.A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área Médico-Odontológica**, 2002, 274f. Tese (Doutorado em Materiais e Processos de Fabricação) – UNICAMP, Campinas, 2002.

SANTOS, M. L.; et al. **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.

SANTOS, M.H., et al. **Synthesis controland characterization of hydroxyapatite prepared wet by precipitation process**. Materials Research, vol7, nº4, 2004.

SECKLER, M.M., et al. **Técnicas de obtención de hidroxiapatita y otros fosfatos de cálcio**. II Curso sobre biomateriales para aplicaiones odontológicas y traumatológicas. Cartagena de Indias, 1998.

SENA, L.A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. Tese(Doutorado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais-107f) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**; tradução: Juergen Heinrich Maar. São Paulo, Edgard Blucher, Ed. Da Universidade de São paulo, 1975.

SILVA, C.C.G.; et al. **Hydroxyapatite Coating on Silicon Nitride Surfaces Using the biomimetic Method**. Materials Research, Vol.11. No. 1, 47-50. 2008.

SILVA, Marcelo Henrique Prado da. **Apostila de Biomateriais**. Disponível em http://www.mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/ApostilaBiomateriais.pdf. Acesso em 15 de janeiro de 2008.

SILVERMAN, L.D., et al . **Release of Gentamicin from a Tricalcium Phosphate Bone Implant**. Wiley InterScience, Journal of Orthophopaedic research January 2007.

SIVAKUMAR, M; PANDURANGA RAO K. **Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres**. Biomaterials 23 (2002) 3175-3181.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ªed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOARES, Glória de Almeida. **Biomateriais**. Fórum de Biotecnologia Biomateriais. Rio de Janeiro, 2005.

SOUZA, S.A. **Ensaio Mecânicos de Materiais Metálicos**. Edgard Blucher LTDA, 3ª ed, 1974.

STEVENS, A; LOWE, J. **Sistema muscular Esquelético**. In: _____. Histologia Humana. São Paulo: Manole, 2000.p. 227-250.

STIGTER, M.; BEZEMER, J.; GROOT, DE K.;LAYROLLE,P.: **Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy**. Elsevier. Journal of Controlled Release 99, 127-137. 2004.

Sulzer Calcitek Inc.. **Catálogo comercial**.

SUSLICK, K. S.; **Ultrasound: its chemical, physical, and biological effects** . Scientific American, 2, 80 1989.

TADIC, D.; WELZEL, T.; SEIDEL. P; WÜST, E.; DINGELDEIN, E.; EPPLE, M.; **Controlled release of gentamicin from biomimetic calcion phosphate in vitro. Comparison of four different incorporation methods**. Mat. - wiss. u. Werkstofftech.v 35, No.12, 2004.

TAKEMOTO, M. **Bone-bonding ability of hydroxyapatite coated zirconia-alumina nanocomposite with a microporous surface**, Journal of Biomedical materials Research Part A DOI 10.1002/jbm.a 30748 p. 693-701, 2006.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2. ed. Belo Horizonte: Atheneu, 1999.

TITORENCU, I.; et al. **New Scaffold Structure Based on Collagen. Fabrication and Biocompatibility Evaluation**. Mol. Cryst. Liq., vol. 486, pp. 147-156, 2008.

TORTORA, G.J.;GRABOWSKI,S.R. **Principios de Anatomia e Fisiologia**. 9ªed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogans S.A., 2002.

VARLET, A.; DAUCHY,P.: **Plaster of Paris pellets containing antibiotics in the treatment of bone infection. New combinations of plaster with antibiotics**. Rev. Chir. Orthop., 69, 239-244.1983.

VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; GUIA, M.M. **Biblioteca Biomédica: Química Fisiológica**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1979.

VLACK, V.; HALL, L. **Propriedades dos materiais cerâmicos**. São Paulo: Edgard Bucher, 1973.

VULCANI, V.C. **Matrizes de Colágeno para Liberação Controlada de Progesterona**. Dissertação de Mestrado. São Carlos – 2004.

YOUNG, R. A. **The Rietveld Method**. New York: Oxford University Press, p.298.1993.

YOUNG, R. A., LARSON, A.C., PAIVA-SANTOS, C.O. **User's Guide to Program DBWS-9807a for Rietveld Analysis of X-Ray and Neutron Powder Diffraction Patterns.** Georgia Institute of Technology, Atlanta, 1999.

WAHLIG, H.; DINGELDEIN, E. **Antibiotics and bone cements.** Experimental and clinical long-term observations. Acta Orthop Scand 51: 49-56.1980.

WILLIAMS, D.F. Definitions in Biocompatibility. Amsterdam: CRC Press, v. 1, 1987.